

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
Arbeitsgruppe für Zellchemie
Leiter: Prof. Dr. W. Hanstein

**HE-DNP und AE-DNP, zwei neue Entkoppler der
oxidativen Phosphorylierung - ihre Wirkungsweise
in mitochondrialen und submitochondrialen Systemen**

Dissertation

zur Erlangung eines Doktorgrades der Medizin
der Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Marcus Schuermann

~~1982:~~

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546407_0062

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

Arbeitsgruppe für Zellchemie

Leiter: Prof. Dr. W. Hanstein

HE-DNP und AE-DNP, zwei neue Entkoppler der oxidativen
Phosphorylierung - ihre Wirkungsweise in mitochondrialen
und submitochondrialen Systemen

Dissertation

zur Erlangung eines Doktorgrades der Medizin
der Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Marcus Schuermann

1982

Dekan: Prof. Dr. J. Werner
Referent: Prof. Dr. W. Hanstein
Korreferent: Prof. Dr. W. Kunau

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 6. 1984

Verzeichnis der Abkürzungen

RLM	Rattenlebermitochondrien
SMP	submitochondriale Partikel
HE-DNP	2,4-Dinitro-6(2'-hydroxyethyl)-phenol
AE-DNP	2,4-Dinitro-6(2'-acetoxyethyl)-phenol
NPA	2-Azido-4-nitrophenol
DNP	2,4-Dinitrophenol
CCCP	Carbonyl-zyanid-m-chlorophenylhydrazone
TTFB	(4,5,6,7)-Tetrachlor-2-trifluoromethylbenz- imidazol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
EGTA	Äthylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl-(1)]-äthan sulfonsäure
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
ACMA	9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin
BOXY	β -Hydroxybutyrat
RCR	Respiratory Control Ratio
REF	Reverse Electron Flow

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau des Mitochondrions	1
1.2 Die Elektronentransportkette	3
1.2.1 Komplex I: NADH-Coenzym Q-Reduktase	5
1.2.2 Komplex II: Succinat-Coenzym Q-Reduktase	5
1.2.3 Komplex III: Coenzym Q-Cytochrom c-Reduk- rase	6
1.2.4 Komplex IV: Cytochrom c-Oxidase	7
1.3 ATP-Synthetase	7
1.4 Andere in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Enzyme	10
1.5 Energiebilanz	12
1.6 Energiepool	13
1.7 Der Mechanismus der oxidativen Phosphory- lierung	13
1.7.1 Der chemiosmotische Kopplungsmechanismus von Mitchell	14
1.7.2 Die Konformationshypothese von Boyer	15
1.7.3 Die "lokalisierte Protonentheorie"	16
1.8 Entkoppler	17
1.9 Der Wirkungsmechanismus von Entkopplern	19
1.10 Anstoß zu eigenen Arbeiten	25
2. Materialien und Methoden	
2.1 Herkunft der verwendeten Substanzen	27
Chemischer Teil	
2.2 Synthese von 2,4-Dinitro-6(2'-hydroxyethyl)- phenol (HE-DNP) und 2,4-Dinitro-6(2'-acet- oxyethyl)-phenol (AE-DNP)	29
2.2.1 Nitrierung des 2-Hydroxyphenethylalkohols	29
2.2.2 Chromatographische Reinigung des Rohprodukts und Analyse	30
2.3 Untersuchungen auf Eigenschaften der her- gestellten Entkoppler	32

2.3.1	Physikalische Methoden	32
2.3.2	Photometrische Bestimmung des pK-Wertes	33
2.3.3	Esterhydrolyse	33
2.3.4	Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungs- koeffizienten	33
2.3.5	Untersuchung der spezifischen Bindung an Rattenlebermitochondrien	34
Biochemischer Teil		
2.4	Allgemeine Methoden	37
2.4.1	Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode	37
2.4.2	Radioaktivitätsmessung	38
2.4.3	Präparation von Rattenlebermitochondrien	39
2.4.4	Isolierung von Rinderherzmitochondrien	40
2.4.5	Schallpartikel nach Löw und Vallin	42
2.4.6	Schallpartikel nach Hansen und Smith	43
2.5	Spezielle Methoden	44
2.5.1	Messung der Atmungskontrolle in Mito- chondrien	44
2.5.2	Reverser Elektronentransport in submito- chondrialen Partikeln	47
2.5.3	Messung der Transhydrogenaseaktivität in submitochondrialen Partikeln	49
2.5.4	Succinat-getriebene Atmung in Schall- partikeln	50
2.5.5	NADH-getriebene Atmung in Schallpartikeln	51
2.5.6	Messung der Aktivität der F_1 -ATPase	51
2.5.7	Durchführung des ATP-Phosphat-Austausches	52
2.5.8	Sauerstoffpulseexperimente an Rattenleber- mitochondrien	54
2.5.9	Substratpulseexperimente an submitochon- drialen Partikeln	55
2.5.10	Oxonol VI-Membranpotentialmessungen an Schallpartikeln	57
2.5.11	Messung der ΔpH -abhängigen ACMA-Fluores- zenzänderung an Schallpartikeln	58

3.	Ergebnisse	
3.1	Ergebnisse der chromatographischen Reinigung - Darstellung zweier neuer Entkoppler	59
3.2	Auswertung der strukturanalytischen Untersuchungen und spektralen Eigenschaften der Entkoppler	62
3.3	Hinweise auf allgemeine Eigenschaften der Membrandurchgängigkeit	68
3.4	Kompetitive Verdrängung des Entkopplers NPA aus seiner Bindungsstelle	72
3.5	Beeinflussung energieabhängiger Funktionen in Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln, insbesondere der energiegetriebenen Transhydrogenase	79
3.5.1	Direkte Einwirkung der Entkoppler auf die Atmungskontrolle in Rattenlebermitochondrien	79
3.5.2	Einfluß auf enzymatische Reaktionen in submitochondrialen Partikeln	83
3.5.2.1	Reverser Elektronentransport	83
3.5.2.2	Transhydrogenasereaktion	85
3.5.2.3	Ergänzende Untersuchungen	92
3.5.2.4	ATP-Phosphat-Austausch	97
3.6	Effekt von HE-DNP und AE-DNP auf die Protonenpermeabilität in Mitochondrien und Schallpartikeln	100
3.7	Einwirkung auf den elektrochemischen Protonengradienten (Membranpotential und Protonengradient)	106
3.8	Zusammenfassender Vergleich der Eigenschaften von AE-DNP und HE-DNP	113

4.	Diskussion	115
5.	Zusammenfassung	123
6.	Literaturverzeichnis	125

1. EINLEITUNG

Lebende Systeme konservieren die Redoxenergie, die in organischem Material und Sauerstoff anwesend sind, um sie in für ihre Zwecke geeignetere Energieformen, nämlich chemische Energie, umzuwandeln. In Zellen höherer Organismen wird diese Funktion von Mitochondrien getragen, die die oxidative Phosphorylierung, d.h. die Umwandlung der freien Energie von Oxidationsvorgängen in die vielseitig nutzbare Energie von Adenosintriphosphat (ATP) katalysieren. Letztere stellt damit die Hauptquelle der verwertbaren Energie in aeroben Organismen dar. Die Mitochondrien werden aufgrund ihrer Funktion auch als "mikroskopische Kraftwerke" der Zellen bezeichnet (1). Das bei der oxidativen Phosphorylierung entstehende ATP enthält energiereiche Phosphorsäureanhydridbindungen und dient in der Zelle als Energiequelle für eine große Anzahl metabolischer endergonischer Prozesse, wie z.B. für die Muskelkontraktion, den Transport von Ionen und kleinen Molekülen und für die Synthesen, die für Wachstum und Aufrechterhaltung des Organismus notwendig sind.

1.1 Aufbau des Mitochondrions

Das Mitochondrion enthält zwei Membranen: eine äußere, die für Moleküle mit Molekulargewichten bis zu einigen Tausend Dalton frei durchlässig ist, ist nur von untergeordneter Bedeutung für die oxidative Phosphorylierung. Die innere Membran, die für die meisten Metabolite undurchlässig ist, schließt den Innenraum, die Matrix, vom äußeren Cytosol ab. Sie bildet durch Einbuchtungen die "cristae mitochondriales". In ihrer aus einer Phospholipiddoppelschicht bestehenden Membran sind alle für die Umwandlung von Substrat-Oxidationsenergie in ATP erforderlichen Enzyme enthalten, die Membranproteine der Atmungskette, die ATPase als Ort der Phosphorylierung sowie weitere energieabhängige Enzyme für spezifische Transportsysteme (s. Abb. 1). Der Lipidanteil der in-

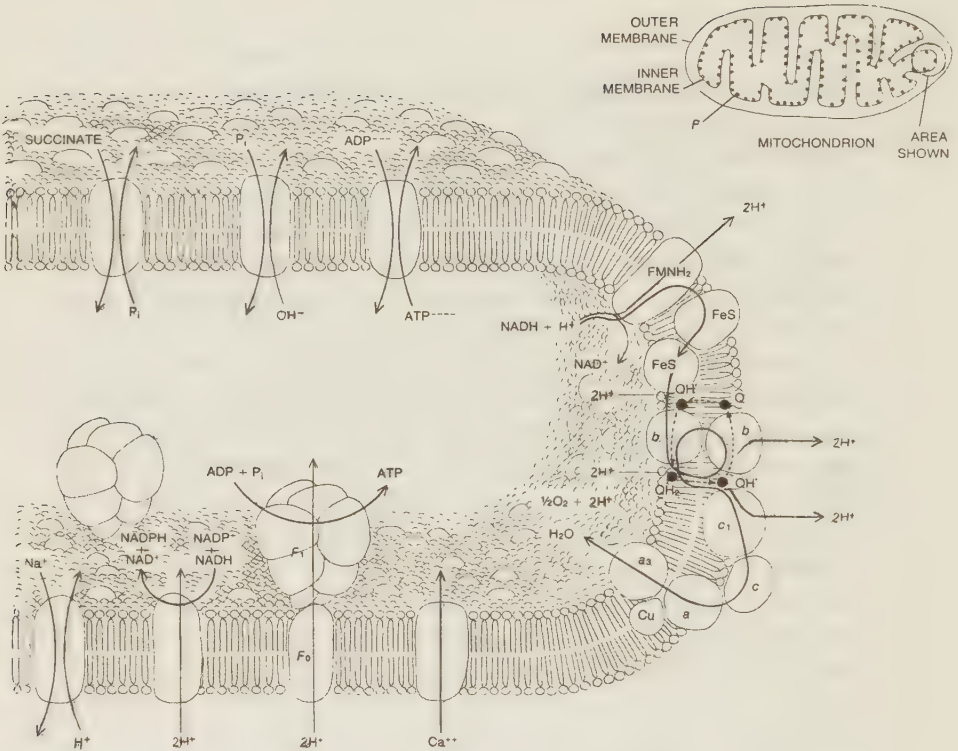


Abb. 1: Aufbau der inneren mitochondrialen Membran (Modellvorstellung). Schema nach Hinkle und McCarty (2)

neren Membran setzt sich hauptsächlich aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cardiolipin zusammen. In jüngerer Zeit wird insbesondere die asymmetrische Orientierung der Phospholipide betont, so z.B. ist Cardiolipin hauptsächlich auf der inneren Seite zu finden (3-5), während Phosphatidylcholin mehr Bestandteil der Cytosolseite ist (5). Phosphatidylethanolamin scheint annähernd gleich verteilt zu sein (3, 4).

1.2 Die Elektronentransportkette

Die Oxidation des Substratwasserstoffs zu Wasser erfolgt über die Atmungskette. Als Wasserstofflieferanten dienen dabei Succinat, vor allem jedoch NADH, das über den Zitratzyklus und die β -Oxidation von Fettsäuren stets nachgeliefert wird.

Die Atmungskette kann sowohl nach ihrem Aufbau als auch nach funktionellen Gesichtspunkten in vier Multiproteinkomplexe aufgeteilt werden (6), die durch die Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom c verbunden sind. Dabei reicht jeder der Multienzymkomplexe durch die Membran hindurch. Das relativ kleine bewegliche Ubichinonmolekül in der Phospholipidphase bewegt sich wahrscheinlich von der einen zur anderen Seite der Membran. Cytochrom c ($M_r = 12\,000$) ist ein auf der cytoplasmatischen Oberfläche angeheftetes Membranprotein, das wahrscheinlich auf der Oberfläche diffundiert und Drehbewegungen ausführt (6).

Ein erstes detailliertes Bild über die Zusammensetzung, Reihenfolge und Dynamik der Atmungskette wurde durch spektral-photometrische Untersuchungen an isolierten Mitochondrien, die z.B. bei tiefen Temperaturen oder unter Verwendung von spezifischen Hemmstoffen durchgeführt wurden, erstellt. (Ein Teil der Hemmstoffe ist in Abb. 2 genannt). Auf der Grundlage derartiger Untersuchungen, auf Fluoreszenzmessungen, chemischen Analysen, auf unter definierten Bedingungen gemessenen Redoxpotentialen sowie durch Verwendung von künstlichen Elektronenakzeptoren oder -donoren, wie z.B. Ascorbat, Tetramethyl-p-phenyldiamin (TMPD), gründen sich die noch nicht in allen Punkten gesicherten Vorstellungen über die Glieder und die Sequenz der Atmungskette (s. Abb. 2).

Es ist heute allgemein anerkannt, daß in Zusammenhang mit dem Transport von Elektronen Protonen auf die Cytosolseite geschafft werden. Der Mechanismus ist dabei noch nicht eindeutig geklärt. Diskutiert wird ein Schleifenmechanismus (s. Abb. 1), d.h. Elektronen werden wiederholt von der Innenseite der Membran zur Außenseite geschafft und umgekehrt, ge-

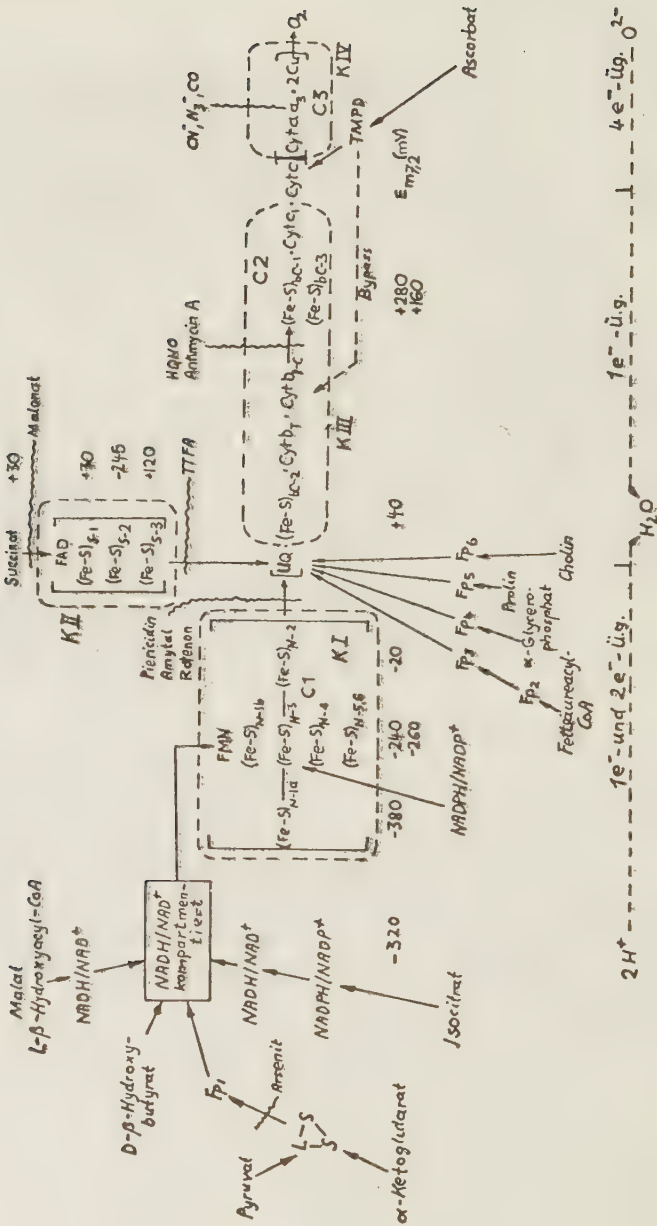
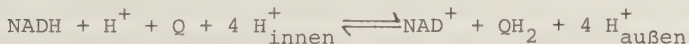


Abb. 2: Schema der Atmungskette. Fe-S = Eisen-Schwefel-Center, Fp1-6 = Flavoproteine, UQ = Ubichinon, Cyt = Cytochrome, HQNO = 2-Heptyl-4-Hydroxyquinolin-N-oxid, TTFA = Thienyltrifluoracetan, C 1-3 = Kopplungsstellen, K I-IV = Komplexe, ü.g. = Übergänge, Lit. [11]

koppelt mit einer vektoriellen Protonenausschleusung (7). Auf der anderen Seite werden eigene Protonenpumpen in der Atmungskette angenommen (8-10) oder eine Kombination aus beiden Möglichkeiten. Dabei wird eine Stöchiometrie von $2 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ pro Kopplungsseite, entsprechend 6 H^+ pro Molekül NADH, das die Atmungskette durchläuft, angenommen (7). Azzone et al. schlagen dagegen eine Stöchiometrie von $4 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ pro Kopplungsseite vor (8-10).

1.2.1 Komplex I: NADH-Coenzym Q-Reductase

Mit 16-18 Untereinheiten und einem Molekulargewicht von 670 000 ist er annähernd bestimmt (6). An prosthetischen Gruppen finden sich ein nicht kovalent gebundenes Flavinmononucleotid (FMN) sowie sieben (6) Eisen-Schwefel-Zentren als Redox-Zentren. Das bei der Nahrungsoxidation größtenteils entstehende NADH findet hier seinen Eingang in die Atmungskette. Andere entstandene Reduktionsäquivalente übertragen den gebundenen Wasserstoff dafür zunächst auf NAD^+ . In Komplex I wird anschließend folgende Reaktion katalysiert:



Entsprechend einem großen Sprung im Redoxpotential wurde hier die erste Phosphorylierungsstelle vermutet (Abb. 2). Die Stöchiometrie von $4 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ gilt heute als weitgehend gesichert (12). Zur Erklärung des Protonentransportes wurde eine FMN-Beteiligung angenommen mit einer Stöchiometrie von 2 H^+ pro oxydiertem FMNH_2 (13). Das sich abzeichnende $4 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ -Verhältnis verlangt jedoch noch einen zusätzlichen bzw. anderen Mechanismus, etwa in Form eines Pumpenmechanismus (14).

1.2.2 Komplex II: Succinat-Coenzym Q-Reductase

Neben NADH gelangt Substratwasserstoff auch über Succinat in die Atmungskette und wird auf Ubichinon übertragen.



Mit dem Elektronenfluß ist hierbei kein vektorieller Protonentransport verbunden (Abb. 2). Komplex II setzt sich wahrscheinlich aus vier Untereinheiten zusammen mit einem Molekulargewicht von 125 000, eine 1 : 1 Stöchiometrie vorausgesetzt (6). An Redox-Zentren sind ein kovalent gebundenes Flavinadenindinucleotid (FAD), ein Cytochrom b und drei Eisen-Schwefel-Zentren vorhanden.

Die Reihenfolge des Elektronenflusses ist noch nicht geklärt. Dabei wird für Komplex II, insbesondere für das FAD, eine durch Konformationsänderung herbeigeführte regulatorische Aktivität angenommen (6).

1.2.3 Komplex III: Coenzym Q-Cytochrom c-Reduktase

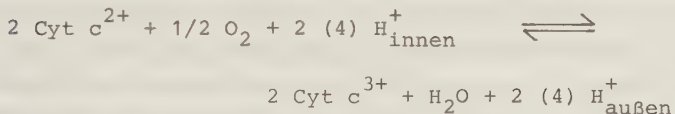
Er überträgt Redoxäquivalente von Ubichinol auf Cytochrom c und transportiert dabei 2 H^+ auf die Cytosolseite. Er besteht aus 8-9 Polypeptiden, darunter zwei Cytochrom b-Moleküle (MG = 30 000), das Rieske Eisen-Schwefel-Protein (MG = 25 000) und Cytochrom c_1 (MG = 29 000). Die Sequenz der Redoxkomponenten im Elektronenfluß ist dabei noch nicht ganz aufgeklärt. Der zwischen den Cytochrom b-Molekülen und dem Eisen-Schwefel-Protein auftretende große Sprung im Halbreduktionspotential wird der zweiten Phosphorylierungsstelle zugeordnet (s. Abb. 2). Die durch Komplex III erfolgende Elektronenübertragung ist mit einer Durchschleusung von Protonen durch die Membran auf die Cytosolseite gekoppelt, wobei sich wahrscheinlich wie bei Komplex I ein Verhältnis von 4 H^+ /2 e^- ergibt (8).



Der Mechanismus dieser Protonenbewegung ist zur Zeit noch unklar. Diskutiert werden ein abgewandelter Ubichinonzyklus oder eine zusätzliche Protonentranslokation durch Cytochrom b, das dabei als Protonenpumpe arbeitet, etwa durch Konformationsänderung.

1.2.4 Komplex IV: Cytochrom c-Oxidase

Dieser Komplex überträgt die Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff, wobei ein Sauerstoffmolekül zu zwei Wassermolekülen reduziert wird (Abb. 2). Er besteht aus zwölf Polypeptiden, darunter zwei, die vier elektronenübertragende Zentren enthalten: zwei Kupferzentren und zwei Hämgruppen, als Cytochrom a und Cytochrom a₃ bezeichnet. Komplex IV wird infolge des hohen Reduktionspotentials die dritte Phosphorylierungsstelle zugeordnet. Der Elektronentransport von Cytochrom c zum Sauerstoff ist mit einem vektoriiellen Protonentransport gekoppelt, d.h. die Cytochrom c-Oxidase funktioniert als Protonenpumpe. Allerdings ist fraglich, ob eine $2 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ - oder eine $4 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ -Stöchiometrie vorliegt. Zusammenfassende Reaktionsgleichung:



Die Atmungskette kann ihre Funktion nur erfüllen, wenn sie laufend Wasserstoff von den zugeführten Substraten aufnimmt und damit den Sauerstoff, der vom Hämoglobin angeliefert wird, reduziert. Dabei stellt sich ein stationärer Zustand ein, der ein Fließgleichgewicht ist und vom Sauerstoffangebot, von Substratkonzentrationen und vor allem von der Kopplung mit dem Phosphorylierungssystem stärker beeinflusst wird als von den Redoxpotentialen (11).

1.3 ATP-Synthetase

Als intakter Teil der inneren Mitochondrienmembran besteht die ATP-Synthetase (Komplex V) aus einem Enzymkomplex, der zunächst als Oligomycin-empfindliche ATPase (OS-ATPase) isoliert wurde und später als ATP-P_i-Austauschkomplex (15), der damit eine wichtige Teilreaktion der oxydativen Phosphorylierung leistet. Komplex V läßt sich unterteilen in einen der

Matrix zugewandten Enzymkomplex (F_1), der als Oligomycin-unempfindliche ATPase isoliert werden kann und einen kleineren aus Phospholipiden und hydrophoben Polypeptiden bestehenden Komplex (F_0 oder Membransektor), der nicht ohne Auflösung der Mitochondrienmembran isoliert werden kann (16). Nach elektronenmikroskopischen Befunden ist F_1 an den Membransektor über einen Stiel gebunden, dessen Zusammensetzung noch nicht weit geklärt ist und der auch nicht einzeln isoliert werden kann (Abb. 3). Der wasserlösliche Teil F_1 setzt sich aus fünf verschiedenen Untereinheiten zusammen: α (MG = 53 000), β (MG = 50 000), γ (MG = 33 000), δ (MG = 17 000) und ϵ (MG = 7-8 000) (14). Hinsichtlich der Stöchiometrie der einzelnen Untereinheiten existieren noch unterschiedliche Vorstellungen. Während Senior eine $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ -Formation annimmt (17), deuten neuere Ergebnisse, die mit Hilfe von chemischen Modifikationen und Rekonstitutionsexperimenten gewonnen wurden, auf eine $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2\epsilon_2$ -Konformation hin (18-20). Dennoch finden sich Resultate, die mit der ursprünglich angenommenen Zusammensetzung in Einklang stehen (21). F_1 trägt mehrere Bindungsstellen für Adeninnukleotide (22), die wahrscheinlich verschiedene Funktionen für die ATP-Synthese einschließlich ihrer Regulation haben. Durch Photoaffinitätsmarkierung konnte eine katalytische Bindungsstelle für die ATP-Hydrolyse auf der β -Untereinheit nachgewiesen werden (23-25). F_1 besitzt daher sehr wahrscheinlich die Voraussetzungen, ADP zu phosphorylieren, ist jedoch für die notwendige Energiezufuhr auf den Membransektor und den Stiel angewiesen.

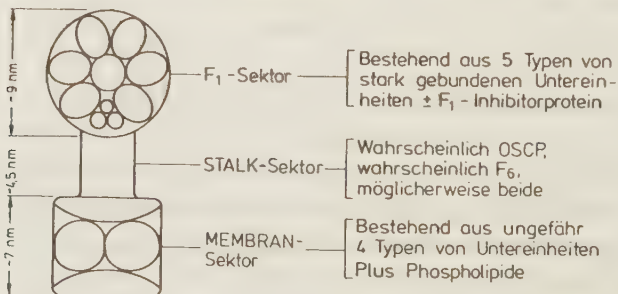


Abb. 3: Morphologischer Aufbau der mitochondrialen ATPase nach Senior (17)

Ein von Pullman und Monroy (26) zuerst gefundenes ATPase-Inhibitorprotein IF_1 ist in der Lage, möglicherweise in einem reversiblen Zwei-Phasen-Mechanismus mit der aktivierten ATPase in Wechselwirkung zu treten und die ATPase-Aktivität sowie den ATP-Phosphat-Austausch zu unterbinden (27). In Chloroplasten und in *E. coli* ist es mit der ϵ -Untereinheit von F_1 identisch, was vielfach angenommen wurde (28); in Rinderherzmitochondrien jedoch sind IF_1 und ϵ verschieden mit Molekulargewichten von 10 500 bzw. 5 700 - 7 500 (27).

Dem membrangebundenen Teil der Rinderherz-ATP-Synthetase werden insgesamt sechs Polypeptide zugeordnet (16), davon zwei als Bestandteile des Stiels und vier als Bestandteile der Bodenplatte, womit die Zahl der am Aufbau der ATPase beteiligten Untereinheiten insgesamt nun bei elf festgelegt scheint (29). Folgende Polypeptide sind identifiziert:

OSCP (oligomycin-sensitivity conferring protein), ein basisches trypsinempfindliches Protein (MG = 22 000), das wahrscheinlich Bestandteil des Stiels ist, Kopplungsfaktor 6 (F_6), ein hitzestabiles Protein (MG = 8 000), das für die Bindung von F_1 an F_0 verantwortlich ist. Ein in Sanadis Labor isolierter Faktor B besteht wahrscheinlich aus einem Proteinoligomer, von denen eines gereinigt ist (MG = 11 - 13 000) und stimuliert die ATP-abhängige NAD-Reduktion durch Succinat, die ATP-abhängige Transhydrogenase sowie den ATP-Phosphat-Austausch (30).

Ein kleines in Beecheys Arbeitskreis zuerst beschriebenes, relativ gut charakterisiertes, hydrophobes Protein (MG = 8 - 9 000) tritt mit Energietransferinhibitoren, wie Oligomycin und Dicyclocarbodiimid (DCCD) in Wechselwirkung. Es ist offenbar am Aufbau des von Mitchell postulierten Protonenkanals beteiligt und damit ein essentieller Teil des Energietransfersystems.

Ein Entkopplerbindungsprotein [UBP (MG = 31000)] wurde von Hanstein mit Hilfe des Dinitrophenol analogen 2-Azido-4-Nitrophenols durch Photoaffinitätsmarkierung postuliert. Es konnte offenbar ausgeschlossen werden, daß das Protein mit dem ADP/ATP-carrier (MG = 30 000) identisch ist (31). Ferner ist es nicht an der Funktion der ATPase als Protonenpumpe beteiligt (29).

Es wird heute allgemein angenommen, daß die ATP-Synthese an der ATPase durch einen elektrochemischen Protonengradienten getrieben wird, wobei das Enzym selbst als Protonenpumpe wirkt. Dabei wurde eine Stöchiometrie von 2 H^+ , die pro gebildetem Molekül ATP nach innen gelangen, vorgeschlagen (7), neuerdings jedoch auch 4 H^+ pro Molekül ATP, das auf die Cytosolseite gelangt (6), d.h. 3 H^+ zur Erzeugung und 1 H^+ zur Ausschleusung eines ATP-Moleküls aus dem Mitochondrion über einen eigenen ADP/ATP-carrier.

Die Funktion der einzelnen Elemente der ATP-Synthetase läßt sich heute so weit erklären, daß der Membransektor einen Protonenkanal durch die innere Mitochondrienmembran bildet, die Untereinheiten γ , δ , ϵ den Protonenfluß kontrollieren (21) und α und β der eigentliche Ort der Phosphorylierung sind. Mit Hilfe neuer gentechnologischer Methoden ist es möglich geworden, in *E. coli* alle ATPase-Untereinheiten bereits zu sequenzieren (32-34), so daß nun besser Einblick in die Enzymfunktion gewonnen werden kann.

ATPase Inhibitoren: Sie können in zwei Klassen eingeteilt werden (35): Die erste Gruppe, darunter Azid, Quercetin, Aurovertin, inhibiert die hydrolytische ATP-Spaltung sowohl an löslichem als auch an membrangebundenem F_1 , die zweite Gruppe, darunter Oligomycin, Rotamycin und DCCD, inhibiert nur membrangebundenes F_1 , da hier der Energietransfer durch F_0 blockiert wird.

1.4 Andere in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Enzyme

Hierzu zählen eine Reihe am Metabolittransport durch die Membran beteiligter carrier-Proteine, die unter Ausnutzung des mitochondrialen Protonengradienten nicht frei permeable Substrate transportieren. Der balancierte Transport der größtenteils negativ geladenen Substrate erfolgt entweder durch Ko-transport von H^+ oder Gegentransport von anderen Anionen. Auch andere Mechanismen sind möglich. Unter den bis jetzt sicherge-

stellten carriern arbeiten im einzelnen der Phosphat-, Pyruvat-, Glutamat-, Ornithin- und Tricarboxylat-carrier durch Protonen kompensierten elektroneutralen Transport, der α -Ketoglutarat- und Dicarboxylat-carrier durch neutralen Anionenaustausch, der Glutamin- und Carnitin-Azyl/Carnitin-carrier sowie ein carrier für neutrale Aminosäuren durch neutralen Metabolitaustausch, hingegen der Glutamat/Aspartat- und Adennucleotid-carrier als elektrogene Transporter, d.h. ohne Ladungsaustausch (36).

Der Dicarboxylat-carrier tauscht HPO_4^{2-} gegen Dicarbonsäureanionen aus, z.B. Succinat oder Malat (durch n-Butylmalonat hemmbar), der Tricarboxylat-carrier hauptsächlich Zitrat + H^+ gegen Malat (durch Mersalyl hemmbar) (36).

Der Phosphat-carrier (MG = 30 000) katalysiert einen elektroneutralen $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{OH}^-$ -Gegentausch bzw. einen $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}^+$ -Kotransport (6) und liefert somit das für die ATP-Synthese benötigte anorganische Phosphat. Geschwindigkeit und Richtung hängen dabei vom transmembranen Protonengradienten ab. Er ist durch N-Ethylmaleiimid markierbar (6).

Adennucleotid-Translokase (ADP/ATP-carrier).

Das Enzym (MG = 30 000) wurde vor allem in Klingenberg's Labor charakterisiert und gewährleistet einen ADP/ATP-Austausch zwischen Matrix und Cytosol. Unter Ausnutzung des ΔpH -abhängigen Membranpotentials ist ein ADP-Transport in die Matrix auch gegen ein im Cytosol höheres Phosphorylierungspotential möglich (6). Diese Asymmetrie ist dann aufgehoben, wenn das Membranpotential der inneren Membran z.B. durch Entkoppler abgebaut wird. Das Enzym selbst wird durch Carboxyatraktylosid oder Bongkrekssäure inhibiert.

Die Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Transhydrogenase ist ebenfalls in der inneren Membran lokalisiert und setzt sich aus zwei 120 000 Dalton Untereinheiten zusammen (37). Sie katalysiert die reversible Reduktion von NADP^+ durch NADH_2 nach der Gleichung



Die Reduktion ist dabei mit einer Protonenaufnahme durch die Membran gekoppelt (38). In rekonstituierten Systemen (Proteoliposomen) konnte nachgewiesen werden, daß die Transhydrogenase eine reversible Protonenpumpe ist (37), die die obige Reaktion abhängig von der Richtung des elektrochemischen Protonengradienten vorwärts oder rückwärts katalysiert.

1.5 Energiebilanz

Die Differenzen der Redoxpotentiale und die entsprechenden freien Enthalpien ergeben bei der Oxidation von Substratwasserstoff zu Wasser eine freie Energie von 220 kJ = 52 kcal pro Mol NADH, das die Atmungskette durchläuft, die zur ATP-Synthese zur Verfügung steht. Messungen in verschiedenen Laboratorien haben ergeben, daß für ein Mol NADH, das 1/2 Mol O₂ verbraucht, 3 Mol ATP gebildet werden. Unter Standardbedingungen sind zur Bildung von 3 Mol ATP 91,8 kJ = 21,9 kcal erforderlich, was einem Wirkungsgrad von 40% bezogen auf die durch NADH-Oxidation gewonnene Energie entspricht. Die tatsächlich zur Bildung von ATP erforderliche Energie ist vom Phosphorylierungspotential abhängig:

$$\Delta G_p = \Delta G^0 + RT \cdot \ln \frac{[ATP]}{[ADP][P_i]}$$

wobei R der Gaskonstante, T der absoluten Temperatur und $-\Delta G^0$ 31,5 kJ/mol entsprechen. Da in der Matrix [ADP] und [ATP] $\ll$ [P_i], wie durch Bestimmung der einzelnen Reaktanden gezeigt werden kann (39), liegt ΔG_p wesentlich höher und dürfte damit bis zu 65 kJ/mol (39) betragen, d.h. daß unter Ruheatmung (state 4-Atmung) fast die gesamte freie Energie der NADH-Oxidation durch Sauerstoff zur ATP-Bildung ausgenutzt wird.

1.6 Energiepool

Das mitochondriale energietransferierende System besteht aus einer Reihe von Einheiten, so die Enzyme der Atmungskette, die ATP-Synthetase, die Transhydrogenase und die Ionentranslokatoren (Abb. 4), die die in Form von Redoxdifferenzen, energiereicher Phosphatbindungen oder elektrochemischer Gradienten gespeicherte Energie dazu benutzen können, Reaktionsabläufe in jeder dieser transferierenden Einheiten zu steuern, dies auch in umgekehrter Richtung. So ist es z.B. möglich, über ATP-Hydrolyse an der ATPase einen rückwärtigen Elektronentransport zu induzieren oder eine durch die Atmungskette gespeiste Transhydrogenasereaktion zu bewirken.

1.7 Der Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung

Während das Elektronentransportsystem und die ATPase bisher schon eingehend untersucht worden sind, ist nur wenig über den molekularen Mechanismus der Kopplung zwischen Elektronenübertragungsreaktion und ATP-Synthese als energieverbrauchende Reaktion bekannt. Im wesentlichen existieren heute dazu drei Vorstellungen:

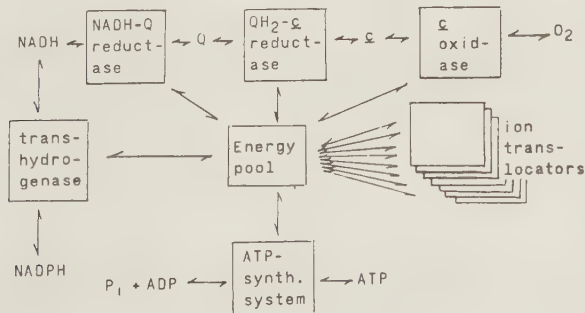


Abb. 4: Einbindung der verschiedenen Enzymsysteme der inneren Mitochondrienmembran in einen gemeinsamen Energiepool [nach Ernster (40)]

1.7.1 Der chemiosmotische Kopplungsmechanismus von Mitchell

Hierbei werden infolge des Elektronentransportes entlang der Atmungskette Protonen nach außen gepumpt, die einen Gradienten $[H^+]$ aufbauen (7, 13; s. Abb. 6). Da ein gleichzeitiger Auswärtstransport von Anionen $[A^-]$ ausbleibt, entsteht ein elektrisches Potential mit einer Negativierung der Innenseite. Somit ergibt sich ein elektrochemischer Gradient, der eine protonengetriebene Kraft darstellt:

$$\Delta\mu = \Delta\psi + \Delta pH$$

mit

$$\Delta\psi = \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[A^-]_{\text{innen}}}{[A^-]_{\text{außen}}}$$

und

$$pH = \log \frac{[H^+]_{\text{außen}}}{[H^+]_{\text{innen}}}$$

wobei gilt: n = Anzahl der Ladungen des Ions,

F = Faraday'sche Konstante (23,08 kcal · V⁻¹)

R = allg. Gaskonstante (8,314 J · mol⁻¹ · K⁻¹)

T = Temperatur (K).

Zur ATP-Synthese ist dabei ein $\Delta\mu$ von 3,5 pH-Einheiten oder 250 mV erforderlich, wobei die Protonen an der ATPase wieder in die Matrix wandern (s. Abb. 1). Voraussetzungen sind eine H^+ -impermeable Membran sowie ein geschlossenes Vesikelsystem, da sonst der Gradient zusammenbricht. ATPase und Atmungskette brauchen hierbei nicht direkt zu interagieren. Die ATPase wird als reversible Protonenpumpe mit charakteristischer H^+ /ATP-Stöchiometrie beschrieben (41). Alle übrigen energieabhängigen Systeme der inneren Membran werden über den Protonengradienten gesteuert. In mehreren Laboratorien konnten diese Thesen bestätigt werden, so daß die Hypothese heute im groben als Arbeitsgrundlage anerkannt ist.

1.7.2 Die Konformationshypothese von Boyer:

Die beim Elektronentransport freigesetzte Energie bewirkt hierbei eine Konformationsänderung der dreidimensionalen Struktur der ATPase (Abb. 5), wodurch vorübergehend ein energiereiches Intermediat, wie z.B. eine Acyl-S-Verknüpfung geschaffen wird, was eine ATP-Synthese ermöglicht (42). Die Konformationshypothese basiert auf der von Slater formulier-

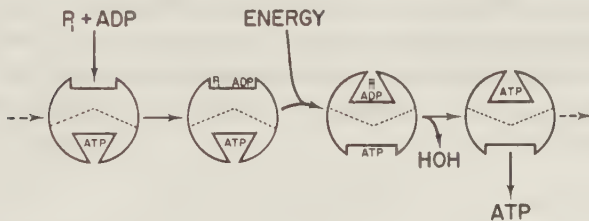


Abb. 5: Modell einer Konformationsänderung der beteiligten ATPase während der ATP-Synthese [nach Boyer (47)]

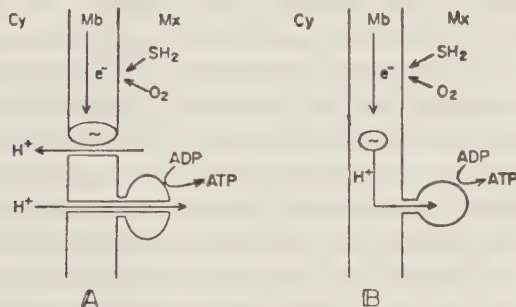


Abb. 6: Rolle der Wasserstoffionen (H^+) bei der Kopplung von Substratoxidation und Phosphorylierung: (A) transmembraner H^+ -Transport nach der chemiosmotischen Theorie, (B) intramembraner H^+ -Transport entsprechend der lokalisierten Protonentheorie. Cy , Cytosol; Mb , Membran; Mx , Matrix; SH_2 , Wasserstoffführendes Substrat; schematisierte Zeichnung nach (49)

ten chemischen Kopplung über energiereiche Intermediärprodukte, die in Analogie zur Substratkettenphosphorylierung ablaufen soll (43). Gestützt wird die Hypothese durch Beobachtungen von Ryrie und Jagendorf über energieabhängige Konformationsänderungen in der Chloroplasten-ATPase (44) sowie einen Bericht von Rydström über eine Konformationsänderung als Basis für NADPH-Bildung durch die energieabhängige Transhydrogenase (45). Ferner lassen sich so an der ATPase und Transhydrogenase gemessene Substrataffinitätsänderungen in energiegekoppelten Reaktionen deuten (46). Wenn auch heute Konformationsänderungen von Enzymen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, möglich erscheinen, so wird dennoch angenommen, daß sie nicht ohne einen gesteuerten Protonenfluß zustande kommen (41).

1.7.3 "Lokalisierte Protonentheorie"

Sie ist im Prinzip eine Abwandlung der chemiosmotischen Theorie von Mitchell, da bei beiden ein Protonenstrom die treibende Kraft bei der Phosphorylierung darstellt. Sie wurde bereits früh von Williams aufgestellt und schlägt anstelle eines transmembranen Gradienten in der Membran lokalisierte Protonenströme als Kopplung zwischen Atmung und Phosphorylierung vor (Abb. 6). Dabei sieht sie eine stöchiometrische Anordnung der energieliefernden und -verbrauchenden Komponenten innerhalb der Membran vor sowie eine stärkere lokale Interaktion (48). Der in Versuchen zwischen den jeweiligen wässrigen Phasen meßbare transmembrane Gradient ist hierbei ein Nebenprodukt. Eine Reihe von experimentellen Beobachtungen lassen sich besser mit der intramembranen als mit einer transmembranen Hypothese verbinden (47, 49, 50). Über ATP-Synthese in nicht-vesikulären Präparationen wurde ebenfalls berichtet (49, 51), was mit einer Kopplung über einen delokalisierten chemiosmotischen Gradienten nicht erklärbar ist. Ebenso konnte der zur ATP-Erzeugung theoretische Betrag für $\Delta\mu\text{H}^+$ bisher nur annähernd gemessen werden, wobei berücksichtigt werden muß, daß in Mitochondrien ein Teil der Energie für Metabolittransport verlorengeht. Einheitliche Aussagen über H^+/e^- - und H^+/ATP -Stöchiometrien exi-

stieren ebenfalls nicht (52). Kell schlägt daher in Anlehnung an Williams einen hauptsächlich zweidimensional orientierten Protonenstrom vor, wobei die lipophile Umgebung nahe der Membran und die dadurch bewirkte Konfiguration von H_2O -Molekülen einen Transport über kürzere Entfernungen gewährleisten (52).

Experimentell ist es zur Zeit schwierig, zwischen einer intramembranen und einer transmembranen Hypothese zu differenzieren. Es dürfte jedoch, ausgehend von der gemeinsamen experimentell bestätigten Grundlage, nicht schwerfallen, sich vorzustellen, daß in der Realität beide Vorgänge möglicherweise auch über Konformationsänderungen energieabhängiger Enzyme an der oxidativen Phosphorylierung in biologischen Systemen beteiligt sind.

1.8 Entkoppler

Entkoppler bilden eine Klasse relativ einfach gebauter organischer Moleküle, die die Fähigkeit besitzen, die Kopplung von Substratoxidation und ATP-Synthese zu unterbinden (53). Normalerweise ist in Mitochondrien die Rate der ATP-Synthese streng mit der Oxidation von Substrat und damit mit dem Verbrauch von Sauerstoff verbunden. Dieses Phänomen bezeichnet man als Atmungskontrolle. Durch Zugabe von Entkopplern wird die ATP-Synthese vermindert oder gestoppt, der notwendige Energiefluß unterbrochen. Die Atmungskette hingegen, nicht mehr durch die Atmungskontrolle behindert, erhöht die Rate des Sauerstoffverbrauchs und produziert Hitze statt ATP (53). Somit unterscheiden sich Entkoppler von Inhibitoren der Atmungskette (Rotenon, Antimycin, KCN), denjenigen der Phosphorylierung (Oligomycin, DCCD) oder des ADP/ATP-carriers, da letztere auch in gut gekoppelten Mitochondrien die Atmung inhibieren. Der Zusammenhang zwischen Entkopplung und oxidativer Phosphorylierung wurde zuerst von Lardy und Elvehjem am Beispiel der Wirkung des Dinitrophenols (54) und von Loomis und Lipmann an Mitochondrien demonstriert (55). Nach Heytler (56) sind es

vier Gesichtspunkte, die Entkoppler erfüllen:

1. Erhöhte Atmungsrate, besonders, wenn die Atmung infolge Abwesenheit von ADP kontrolliert verläuft ("state 4"-Atmung).
2. Inhibierung verschiedener Austauschreaktionen an der ATPase, wie $^{33}\text{P}_i$ -Austausch zwischen P_i , ATP und ADP sowie ^{18}O -Austausch zwischen P_i , H_2O und ATP.
3. Stimulierung der ATPase-Aktivität.
4. Osmotische Schwellung in Mitochondrien und damit verbunden verminderte Lichtstreuung bzw. Trübung der Mitochondrienlösung.

Um die Wirkung einer Substanz als Entkoppler näher zu bestimmen, reichen im allgemeinen die Messung der Atmungskontrolle, des P/O-Quotienten, der ATPase-Aktivität und des ATP- $^{33}\text{P}_i$ -Austausches aus.

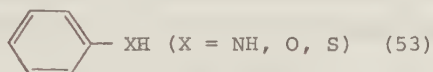
Die Wirksamkeit der einzelnen Entkoppler kann unterschiedlich stark sein. Um die Atmungskontrolle in Mitochondrien zu 50% zu entkoppeln, benötigt man etwa $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ S 13, dagegen 10^{-5} M Dinitrophenol oder Dicoumarol (56).

"Klassische" Entkoppler: Obwohl sie in ihrer Wirkung verschieden sind, haben sie eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften.

Alle sind schwache Säuren, ihre pK-Werte liegen meist zwischen 4 und 8. Zu ihnen zählen heute weit mehr als 100 Substanzen, darunter Salicylanilide (S 13), Benzimidazole (TTFB), Benzylidenmalononitrile (SF 6847), Carbonyl-Zyanid-Phenylhydrazon (CCCP, FCCP), nitrierte und halogenierte Phenole und nicht aromatische fluorierte Alkohole (1799) sowie Dicoumarol.

Ein mit Ausnahme der fluorierten Alkohole aromatisches lipophiles Grundgerüst ist elektronegativ substituiert, so daß der aromatische Ring eine elektronenanziehende Kraft ausübt. Ferner ist durch die elektrophile Substitution die Beweglichkeit der π -Elektronen vergrößert. Somit wird nach Dissoziation des Moleküls die Ladung besser verteilt (delokalisiert), die Moleküle können daher besser in eine neutrale Lipidmembran eindringen.

Phenole: Sie bilden die größte Gruppe. Gemeinsame Merkmale sind eine Phenol- oder Anilinkonfiguration, elektronegativ am Benzolring und am Stickstoff in Position X substituiert.



Nicht-klassische Entkoppler: Zu ihnen zählen Kationen, wie Ethidiumbromid, Tetraphenylarsonium und K^+ , das im Zusammenhang mit dem Ionophor Valinomycin wirkt. Sie verursachen einen gesteigerten Ionentransport, der den größten Teil der im elektrochemischen Gradienten gespeicherten Energie verbraucht. Ebenso wirken eine Vielzahl alkylierender Substanzen entkoppelnd (53), wahrscheinlich durch Interaktion mit der Membran. Auch für Carbonyl-Zyanid-Phenylhydrazone werden alkylierende Reaktionen, wie Bindung an SH-Gruppen, für die entkoppelnde Wirkung mitverantwortlich gemacht (46, 58). Fettsäuren sind ebenfalls als Entkoppler bekannt. Sie häufen sich vor allem in älteren Mitochondriensuspensionen an aufgrund gesteigerter Aktivität der Phospholipase A (59). In hohen Konzentrationen beruht ihre Wirkung auf einer Desintegration der Membran. In niedrigen Dosen können sie eventuell durch Einlagerung in die Membran die Beweglichkeit der Komponenten der Atmungskette erhöhen (60). Eine Wechselwirkung mit bestimmten Proteinen wird ebenfalls diskutiert (59).

1.9 Der Wirkungsmechanismus von Entkopplern

Über den Mechanismus, wie Entkoppler zwischen Atmungskette und Phosphorylierungsseite eingreifen, bestehen noch Unklarheiten. Die Vorstellungen über ihre Wirkungsweise richten sich dabei hauptsächlich nach den jeweils aufgestellten Hypothesen über den Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung. Schon kurz nach ihrer Entdeckung wurde den Entkopplern, entsprechend der geltenden chemischen Kopplungshypothese, eine Säure/Basen-Katalysatorfunktion zugeschrieben, die ein Hoch-

energieintermediat abbaut (55), ohne daß eine experimentelle Bestätigung möglich war.

Wirkung am gesamten Mitochondrion

Eine Abhängigkeit der Entkopplerwirkung vom pK-Wert der Substanz, pH-Wert des umgebenden Mediums und vor allem von der Lipophilität der Entkoppler wurde von De Deken (61), Hemker (62), Parker (63) und Whitehouse (64) gezeigt. Hansch hat weitergehend zur Klärung der Beziehung zwischen Struktur und Funktion den Oktanol/Wasser-Koeffizienten als Maß für Lipophilität sowie elektronische Parameter der verwendeten Substanzen in Form der Hammett σ -Konstanten ausführlich untersucht und dabei eine lineare Beziehung zwischen Struktur und Verhalten von Derivaten gegenüber den entsprechenden Mutter-

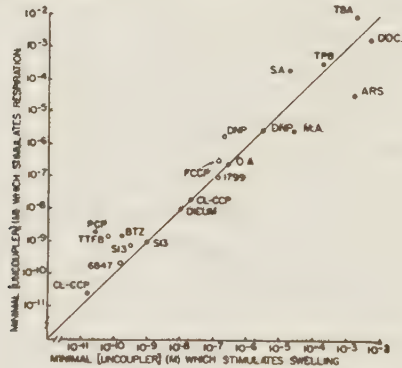


Abb. 7: Korrelation zwischen der durch Entkoppler induzierten Schwellung und der Stimulierung der Atmungsrate in Mitochondrien. DNP, Dinitrophenol; BTZ, SH-benzothiazol; SA, Thioisalizylsäure; FCCP, Carbonyl-zyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon; Cl-CPP, Carbonyl-zyanid-m-chlorophenylhydrazon; 1799, 2,2'-bis(hexafluoracetyl)acetone; Dicum, Dicoumarol; 6847, SF-6847; TTFB, 2-Trifluormethyltetrachlorbenzimidazol; S 13, 5-Chlor-3-t-butyl-2'-chlor-4'-nitrosalizyl-anilid; PCP, Pentachlorphenol; RFB, Tetraphenylborat; TBP, Tributylamin; O.A., Ölsäure; M.A., Myristinsäure; DOC, Desoxycholat; ARS, Arsenat.
Nach Cunarro und Weiner (68)

substanzen gefungen (65-67). Danach sind vor allem hohe Lipophilität und ein hoher Säuregrad für Entkopplung verantwortlich. Diese Kriterien reichen jedoch nicht aus. 3,5-Dibromo-4-zyanophenol ist z.B. 6 - 9 mal effektiver als DNP, obwohl Lipophilität und pK-Wert fast identisch sind (63).

Wirkung an Membranen:

Eine sehr gute Korrelation besteht zwischen dem Anschwellen der Mitochondrien (Abnahme der Lichtstreuung) und Stimulierung der mitochondrialen Atmungsrate für fast alle Entkoppler, wie Abbildung 7 demonstriert. Hierbei sind sogar nicht zu den aromatischen Entkopplern zählende, in hohen Konzentrationen wirkende Detergentien, Amine und auch Arsenat erfaßt. Schon vorher hat Mitchell aufgrund von Säure-Basen-Titrationsexperimenten an Mitochondrien die protonophoretische Eigenschaft von Entkopplern beschrieben und in seine chemiosmotische Hypothese integriert (7). Danach beruht der Mechanismus der Entkopplung auf einer Erhöhung der Membranpermeabilität durch in zyklischer Weise stattfindenden Transport von Entkopplermolekülen von der Membranaußen- zur -innenseite, gekoppelt mit einem Nettoeinstrom von H^+ , wodurch der durch Substratoxidation erzeugte elektrochemische Protonengradient kollabiert. Experimente an Phospholipidliposomen und Doppelmembranen konnten zeigen, daß Entkoppler in der Tat Schwellung induzieren und gleichzeitig die elektrische Leitfähigkeit erhöhen (69-73), was auch mitunter in Korrelation zur Aufhebung der Atmungskontrolle steht (68, 70, 74). Ting und Wilson fanden bei diesen Experimenten jedoch auch Abweichungen (72, 73). Finkelstein (75) und McLaughlin (76, 77) nahmen dabei einen Mechanismus an, bei dem ein Dimer $[HA_2^-]$ aus neutralem Entkopplermolekül $[HA]$ und entsprechendem Anion $[A^-]$ die Membran aufgrund der besseren Löslichkeit infolge stärker delokalisierter Ladung permeiert und den Ladungsaustausch bewirkt. Nach Chen und Hsia (78) werden diese Effekte durch die Gegenwart von neutraler und anionischer Form in der polar-unpolaren Zwischenphase der Phospholipidmembran ausgelöst. Verma (79) nimmt dabei eine Strukturänderung der Doppelmembran an, die eine Permeabilitätserrhöhung zur Folge hat.

Einen weiteren Schritt unternahmen Green et al., indem sie versuchen darzulegen, daß Entkoppler nicht nur protonophoretische, sondern auch ionophoretische Eigenschaften besitzen und damit der Kombination Valinomycin + Nigericin + K^+ entsprechen (80-82). Tyson fand eine Potenzierung der Entkopplerwirkung in Gegenwart von monovalenten oder divalenten Kationen (81), wenn auch eine direkte ionophoretische Eigenschaft von Entkopplern für Kationen erst im Bereich pH 8-10 demonstriert werden kann (81). Allerdings scheinen Versuche an künstlichen Lipidmembranen dieser postulierten carrier-Funktion für Kationen zu widersprechen (84), wie auch ansonsten ein direkter Nachweis einer solchen Entkopplerfunktion noch nicht erbracht ist.

Wechselwirkung mit Proteinen:

Van Dam und Slater stellten 1967 eine Theorie auf, nach der die anionische Form der Entkoppler über eine Reihe von carrier-Proteinen in das Innere des Mitochondrions gepumpt und dabei gegen OH^- oder gegen die entsprechenden Substrate ausgetauscht werden, und im Gegensatz zu diesen Anionen wieder frei zurückdiffundieren können (84, 85). Auf der Grundlage dieses Mechanismus könnte die von Hülsmann (86) und Hemker (87) festgestellte Atmungsinhibierung durch Entkoppler in hohen Konzentrationen erklärt werden. Wenner, Wilson und Merz konnten in der Tat für den Succinattransport eine kompetitive Inhibierung durch Entkoppler zeigen (88, 89). Widerlegt werden konnte diese These jedoch von Stockdale und Selwyn, die als Ursache für die beobachtete verminderte Atmungsrate eine Inhibierung der Succinatdehydrogenase durch Entkoppler nachwiesen (90).

Weinbach und Garbus stellten fest, daß in der reinen Proteinfraction in Mitochondrien mehr Entkoppler gebunden wurde, als theoretisch aufgrund unspezifischer Bindung erwartet wurde (91). Sie nahmen daher eine Wechselwirkung zwischen Entkoppler und Protein in Form einer Konformationsänderung an (92).

Mit Hilfe des neuen, hydrophilen Entkopplers 2-Azido-4-nitrophenol (NPA) konnten Hanstein und Hatefi die Existenz einer spezifischen Entkopplerbindungsstelle neben unspezifischer Bindung nachweisen und durch kovalente Bindung von radioaktivem [^3H]NPA an der ATPase markieren (58). Weitere Studien haben ergeben, daß bei der kovalenten Bindung ein 56 000 Dalton Polypeptid, das als α -Untereinheit von F_1 identifiziert wurde, und ebenfalls ein 31 000 Dalton Polypeptid im F_0 -Sektor, als Entkopplerbindendes Protein (UBP) bezeichnet, markiert wurden. Abb. 8 zeigt eine daraufhin entwickelte hypothetische Struktur der Entkopplerbindungsstelle. Das DCCD-bindende Pro-

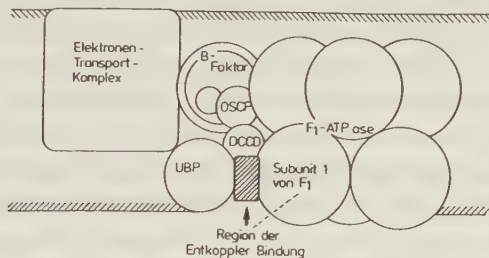


Abb. 8: Hypothetische Struktur der Entkopplerbindungsstelle nach Hanstein (53). An ihr sind sowohl das Entkopplerbindende Protein im Membransektor F_0 als auch die α -Untereinheit von F_1 sowie das DCCD-bindende Protein (zu F_0 gehörig) beteiligt. Die Komplexe der Elektronentransportkette werden aus Gründen der Interaktion von Entkopplern mit Atmungsketteninhibitoren in unmittelbarer Nähe vermutet.

tein (MG = 8-9 000) ist ebenfalls markiert worden, und es wurde angenommen, daß es an der Bindungsstelle beteiligt ist. Auch andere Entkoppler (DNP, Pentachlorphenol, S 13, Pikrat) binden an dieser Stelle und können NPA kompetitiv verdrängen (53). Die damit verbundene Frage der Stöchiometrie im Bindungsverhalten von Entkopplern wird von anderen Autoren verneint (93-95). So scheint der Entkoppler SF 6847, ein Benzylidinmalononitrilderivat, schon in substöchiometrischen Konzentrationen bezogen auf Cytochrom a bereits maximal zu entkopplern. Nach Terada und van Dam (96) kommt Entkopplern

somit eine katalysierende Funktion zu. Dennoch zeigt sich eine Analogie zwischen der jeweiligen Dissoziationskonstanten (K_D) eines Entkopplers am Entkopplerbindenden Protein und der halbentkoppelnden Konzentration ($\phi_{1/2}$) an Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung (58), so daß eine Stöchiometrie durchaus als für den Prozeß der Entkopplung notwendig betrachtet werden kann. Ferner deuten die Verhältnisse $\phi_{1/2}/K_D$ von etwa 1,3 darauf hin, daß Bindung an das Entkopplerbindende Protein für den Entkopplungsprozeß wahrscheinlich verantwortlich ist, zumindest aber daran mitbeteiligt ist (58).

Weitere Hinweise für diese Annahme haben sich durch das Verhalten des Entkopplers Pikrat ergeben (96). Pikrat, mit DNP und NPA nahe verwandt, ist in intakten Mitochondrien nicht in der Lage, die oxidative Phosphorylierung zu entkoppeln, wie bereits Leader und Whitehouse feststellten (97). Dagegen können in submitochondrialen Partikeln, die infolge Ultraschallbehandlung eine nach außen gestülpte innere Membran aufweisen, alle energieabhängigen Reaktionen effektiv entkoppelt werden (96), wobei Pikrat NPA kompetitiv aus der Entkopplerbindungsstelle verdrängt. Somit zeigt sich, daß die Entkopplerbindungsstelle an der Innenseite der Membran gelegen ist und nur membrangängigen Entkopplern zugänglich ist. Pikrat ist ein gutes Beispiel dafür, daß der Mechanismus der Entkopplung nicht allein durch protonophoretische Eigenschaften erklärt werden kann, denn Pikrat erhöht die Protonenpermeabilität auch in Schallpartikeln nur wenig (96).

Der Mechanismus der Entkopplung ist somit noch Diskussionsgegenstand. Eine Reihe von beobachteten Effekten mögen Nebenwirkungen sein, die ihre Ursache in den jeweiligen mit der Molekularstruktur verbundenen chemischen Eigenschaften finden. Dabei ist fraglich, ob die verschiedenen Entkopplerklassen über einen einheitlichen Mechanismus verfügen. Es bedarf weiterer experimenteller Ergebnisse, um darüber Klarheit zu erhalten.

1.10 Anstoß zu eigenen Arbeiten

Der Nachweis einer Entkopplerbindungsstelle durch Hanstein gibt Anlaß zu neuen Vermutungen über den Mechanismus der Entkopplung. So ist es möglich, daß Entkoppleranionen an der Bindungsstelle auf der Innenseite der Membran gebunden, von außen protoniert werden und wieder nach innen abdissoziieren, so daß sich ein Nettoeinwärtsstrom von H^+ ergibt, der dem elektrochemischen Gradienten entgegenwirkt (58). Insbesondere das Verhalten der Entkoppler Pikrat und auch Tetraphenylborat, die infolge ihrer sehr niedrigen pK-Werte im physiologischen Bereich praktisch ausschließlich als Anionen existieren, ließ darauf schließen, daß Entkopplung nicht analog mit der Erhöhung der Membranpermeabilität einhergeht, sondern eher eine Funktion der spezifischen Bindung an Untereinheiten der F_1 -ATPase darstellt (96, 98).

Um den Zusammenhang zwischen Entkopplerbindung, Entkopplung und Erhöhung der Protonenleitfähigkeit besser zu untersuchen, scheint es angebracht, neuartige entkopplerartige Verbindungen zu synthetisieren, die sich dadurch auszeichnen, daß sie membranimpermeabel oder wenig permeabel sind, jedoch wie andere Entkoppler protonierbar, d.h. einen pK-Wert größer als 3,5 besitzen. Unter den möglichen Strukturen, die diese Bedingung erfüllen, wurde 2,4-Dinitro-6-(β -hydroxyethyl)phenol (HE-DNP) gewählt, erstens, um eine nahe Verwandtschaft zum Dinitrophenol und 2-Azido-4-nitrophenol zu haben, mit denen bereits vorher gearbeitet worden ist, zweitens, um an einer Stelle hydrophile Substituenten anzuknüpfen, an der sich auch bei anderen Entkopplern (z.B. S.13) ebenfalls große Substituenten befinden. Das Phenolgrundgerüst mit elektronegativen Substituenten bleibt somit für die Entkopplerwirkung erhalten. HE-DNP ist vorerst ein erster Schritt auf dem Weg zu einem membranimpermeablen Entkoppler, da die freie Hydroxylgruppe an der aliphatischen Seitenkette weiteren chemischen Modifikationen zugänglich ist. Auf diesem Wege ist es jedoch notwendig, zunächst Eigenschaften des erhaltenen Produkts zu untersuchen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es daher gewe-

sen, die Verbindung HE-DNP zu synthetisieren und zusammen mit dem dabei erhaltenen acetylierten Produkt 2,4-Dinitro(6-acetoxyethyl)phenol (AE-DNP) auf Entkopplerwirkung, Membrandurchlässigkeit, Wirkung auf die Protonenpermeabilität sowie den Einfluß auf energieabhängige Reaktionen in Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln zu prüfen. Nicht zuletzt sollen die Substanzen auf ihre mögliche Wechselwirkung mit der Entkopplerbindungstelle untersucht werden, um ihre Eignung für weitere Zwecke festzustellen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Herkunft der verwendeten Substanzen

Entkoppler:

HE-DNP (2,4-Dinitro-6(2'-hydroxyethyl)-phenol) und
AE-DNP (2,4-Dinitro-6(2'-acetocyethyl)-phenol wurden im
Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.
NPA (2-Azido-4-nitrophenol) wurde im Labor synthetisiert.
DNP (Dinitrophenol) (Eastman)
CCCP (Carbonyl-zyanid-m-chlorophenylhydrazone) (Dr. P. Heyt-
ler, Du Pont)
TTFB [(4,5,6,7,)-Tetrachlor-2-trifluoromethylbenzimidazol]
(Dr. E.P. Bakker, Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen,
RU-Bochum)

Inhibitoren:

Rotenon (Serva)
Oligomycin (Boehringer)
Valinomycin (Boehringer)

Enzyme:

Glutathionreduktase (Sigma; type III, Hefe; Suspension in
3,6 M NH_4SO_4 , pH 7,0, 227 U/ml)
Lactatdehydrogenase (Boehringer; aus Schweineherz, als
Kristallsuspension, 25 mg/ml)
Protease (Sigma; type VII, aus *Bacillus amyloliquefaciens*,
12,2 U/mg)
Pyruvatkinase (Boehringer; aus Kaninchenmuskel, als
Kristallsuspension, 10 mg/ml)

Eichproteine:

Chymotrypsinogen A, Cytochrom C, Ei-Albumin (Serva)
Rinderserumalbumin (Sigma; im wesentlichen frei von Fett-
säuren)

Flüssig - Szintillationsspektrophotometrie:

Naphtalin (Bayer, p.A.), PPO (Koch, p.A.), Dioxan (Bayer, dest.), H_2O_2 (Baker, 30%), Soluene-100 (Packard), T_2O (New England Nuclear), H^{33}PO_4 (New England Nuclear)

Übrige Chemikalien (soweit nicht im Folgenden genannt):

Baker: Tris (p.A.)

Boehringer: D, L-3-Hydroxybutyrat, NADH, NAD, NADP, ADP, ATP, Phosphoenolpyruvat

Fluka: EGTA (p.A.), Dowex 50 H^+

Merck: Ammoniumheptamolybdat (p.A.), Glycylglycin (Gehalt 99%), HEPES (Gehalt 99%), D-Mannit, 1-Octanol (rein), Saccharose, Succinat (p.A.)

Serva: Na-Desoxycholat (p.A., 2 x krist.)

Sigma: Glutathion (oxid., Grade VI)

Oxonol VI wurde im Labor synthetisiert, ACMA war eine Gabe von Dr. E.P. Bakker.

Lösungen:

AE-DNP, HE-DNP: 5,33 mM bzw. 4,97 mM in K-Phosphatpuffer, pH 7,6 (HCl);
5,10 mM bzw. 5,00 mM in n/100 NaOH, pH 7,5 (HCl);
Aufbewahrung bei $+4^\circ\text{C}$

NPA: 2,55 mM und 3,4 mM in n/100 NaOH, pH 7,3 (HCl);
Aufbewahrung lichtgeschützt bei -20°C

DNP: 20 mM in 50 mM Tris - H_2SO_4 , pH 7,4;
Aufbewahrung bei $+4^\circ\text{C}$

CCCP: 20 mM in Äthanol;
Aufbewahrung lichtgeschützt bei -20°C

TTFB: 1 mM in Äthanol

Rotenon, Oligomycin, Valinomycin: 1 mg/ml in Äthanol;
Aufbewahrung bei -20°C

ATP: 0,34 M und 0,5 M in H_2O , pH 7,2 (KOH);
Aufbewahrung bei -20°C

Succinat: 1 M in H_2O , pH 7,4 (NaOH); Aufbewahrung bei $+4^\circ\text{C}$

ADP: 0,2 M in H_2O , pH 7,0 (NaOH); Aufbewahrung bei -20°C

Alle anderen Substanzen wurden in der erforderlichen Menge in H_2O gelöst.

CHEMISCHER TEIL

2.2 Synthese von 2,4-Dinitro-6(2'-hydroxyethyl)-phenol (HE-DNP) und 2,4-Dinitro-6(2'-acetoxyethyl)-phenol (AE-DNP)

Vorgegangen wurde nach der Methode von Dutton et al. (99). 2'-Hydroxyphenethylalkohol (Aldrich) wurde als Ausgangsmaterial benutzt. Um größere Mengen zur Weiterverarbeitung zu erhalten, wurden die beiden Entkoppler insgesamt dreimal synthetisiert.

2.2.1 Nitrierung des 2'-Hydroxyphenethylalkohols

8,9 g 2'-Hydroxyphenethylalkohol wurden zu 20 ml Eisessig in einen Schütteltrichter gegeben. In einem Rundkolben werden unter Eiskühlung 13 ml Salpetersäure ($d = 1,5$) langsam zu 25 ml Essigsäure gefügt. Unter stetigem Rühren mit einem Magnetrührer setzt man tropfenweise das Phenethylalkohol-Eisessiggemisch der Lösung im Rundkolben zu. Nach 30-40 Minuten ist der Vorgang beendet. Die Temperatur bleibt während der Nitrierung bei $0^{\circ}\text{C} - +4^{\circ}\text{C}$. Anschließend läßt man noch ca. 2 Stunden im Eisbad rühren. Die erhaltene, rötlich-orangefarbene Menge wird auf 250 g Eis gegossen, unter Zusatz von 50 ml Chloroform über Nacht bei Raumtemperatur im Erlenmeyerkolben gerührt. Man erhält eine dunkelrote wässrige Phase über einer orangefarbenen Chloroformphase. Letztere wird abgetrennt, zweimal mit Wasser geschüttelt und nach Filtrieren über MgSO_4 getrocknet. Nach Abfiltrieren des MgSO_4 wird die Chloroformphase am Rotationsverdampfer eingedampft. Die übrigbleibenden Nitrierungsprodukte bilden eine zähe klebrige, bräunlich-rote Masse.

Bei einem zweiten Syntheseansatz wurde die Nitrierung mit Hilfe eines Kochsalz-Eisgemisches auf ca. -12°C bis -15°C gekühlt. Die Zugabe der Hydroxyphenethylalkohol-Eisessiglösung erfolgte dann über 65 Minuten.

Bei der dritten Synthese wurde jeweils die dreifache Menge der Reagentien verwendet, die Nitrierung erfolgte wie oben beschrieben lediglich unter Eiskühlung; entsprechend der Menge wurde der Hydroxyphenethylalkohol über 105 Minuten zugesetzt.

2.2.2 Chromatographische Reinigung des Rohprodukts und Analyse

Säulenchromatographie:

Zur chromatographischen Trennung der Phenolderivate eignete sich am besten ein System aus Eisessig (Merck, p.A.) und Dichlormethan in einem Verhältnis von 1:9 (v/v). Zur Elution der lipophileren Anteile (Vorlauffraktionen) kann das Verhältnis auf 1:49 erhöht werden. Die Trennung erfolgt über feinem Kieselgel.

Das bei der Nitrierung erhaltene Rohprodukt wird in Chloroform oder Aceton gelöst. Anschließend wird mittelfeines Kieselgel (Merck; Korngröße 0,063 - 0,200 mm $\hat{=}$ mesh 70 - 230) ungefähr im Verhältnis 2:1 bezogen auf das Gewicht der Rohmasse hinzugefügt. Im Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel evaporiert, die an Kieselgel adsorbierte Entkopplermenge auf eine mit feinem Kieselgel (Merck; Korngröße $< 0,063$ mm $\hat{=}$ > 230 mesh) in Dichlormethan aufgeschlemmte Säule gegeben (Bettvolumen ungefähr 100 ml pro Gramm Rohmasse).

Eluiert wird mit Methylenchlorid-Essigsäure (9:1, v/v). Methylenchlorid war entweder als technisches Produkt zur Reinigung größerer Mengen oder als p.A. Lösung nach DAB 7 (Baker) für kleinere Mengen sowie für die jeweils letzte Reinigung in Gebrauch. Die Fraktionen wurden im LKB Fraktionskollektor (Ultrorac, Modell UA-5) aufgefangen. Zur besseren Reinigung wurde der Vorgang mehrfach wiederholt, allerdings jeweils mit den gewonnenen Hauptfraktionen. Bei der Auftrennung der schneller laufenden Fraktionen bewährte sich 2% Eisessig in Methylenchlorid (1:49, v/v) als Laufmittel. Die Analyse auf Reinheitsgrad erfolgte nach der unten beschriebenen Methode

der Dünnschichtchromatographie. Nach Abschluß der Säulenchromatographie wurden die rein erhaltenen Fraktionen im Rotationsverdampfer evaporiert und auf Auskristallisation der Entkoppler geachtet.

Dünnschichtchromatographie:

Diese Methode wurde analog der zur analytischen Prüfung des Entkopplers NPA beschriebenen Weise (100) durchgeführt, erstens zur Unterscheidung zwischen den einzelnen Fraktionen und zweitens zur Kontrolle der Reinheit des erhaltenen Produkts. Entsprechende Kieselgelplatten (Merck; Kieselgel 60 F 254 DC Fertigplatten mit Konzentrierungszone; 20 x 10 cm oder 20 x 20 cm) werden nach Auftragen der Substanzen in einer mit Lösungsmittel gesättigten Glaskammer ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur (21°C) entwickelt. Als Laufmittel dienen Methylenchlorid-Essigsäuremischungen im Verhältnis 9:1 bzw. 49:1 v/v (s.o.). Nach Trocknen werden die gewanderten Zonen mit Ammoniakdampf sichtbar gemacht. Rf-Werte ergeben sich aus dem Verhältnis Laufstrecke der Probe zur Laufstrecke des Lösungsmittels.

Umkristallisation:

Zur weiteren Aufarbeitung werden die gelblichen groben, noch verunreinigten Kristalle in etwas Aceton gelöst. Durch wenig Zugabe von Wasser, je nach Löslichkeit des Entkopplers im Verhältnis 1:2 bis 2:1 (Wasser/Aceton), wird das Löslichkeitsprodukt überschritten und die Lösung wird trüb. Über Nacht bilden sich nadelfeine, hellgelb bis gelbliche Kristalle, die über einem Büchnertrichter abgenutscht und in einem Eksikator über Kieselgel getrocknet werden. Der Reinheitsgrad wird mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie festgestellt. Insgesamt wurden die Proben drei- bis viermal umkristallisiert sowie teilweise noch einmal durch Säulenchromatographie gereinigt.

2.3 Untersuchungen auf Eigenschaften der hergestellten Entkoppler

2.3.1 Physikalische Methoden

Schmelzpunktbestimmungen wurden an einem Heiztischmikroskop nach Kofler der Firma Reichert, Österreich, durchgeführt, wobei nicht mehr als 3°C pro Minute erwärmt wurde. Die Bestimmung erfolgte jeweils dreimal.

Elementaranalyse: Eine Probe HE-DNP wurde im Ilse Beetz Mikroanalytischen Laboratorium, 8640 Kronach, der Elementaranalyse unterworfen und die prozentualen Anteile von Kohlenstoff, Stickstoff und Wasserstoff mit den berechneten Werten verglichen.

Spektrale Untersuchungen

Infrarotspektren einer Probe HE-DNP bzw. AE-DNP wurden im Bereich $200-4000\text{ cm}^{-1}$ an einem Perkin-Elmer 157 Natrium Chlorid Spektrophotometer bzw. Perkin-Elmer 325 Infrarot Gitterspektrophotometer außerhalb des Labors aufgezeichnet. Dazu wurden 3-5 mg Substanz mit RbJ vermischt und unter einem Druck von 10 kp/cm^2 zu einer durchsichtigen Tablette gepreßt.

NMR-Spektren wurden von Frau Dröge, Spektrosk.-Chromatogr. Abteilung an der RU-Bochum, NC 04/128, aufgezeichnet. 60 MHz-Spektren wurden am Elmer R 12, 80 MHz-Spektren am WP 80 (Bruker) sowie ein 90 MHz-Spektrum am WH 90 Gerät (Bruker) durchgeführt. Die Proben wurden in Deuteriochloroform (CDCl_3) bzw. Deuteroacetone [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] gelöst; als Referenzsubstanz wurde Tetramethylsilan (TMS) benutzt.

Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich wurden am Shimadzu Doublebeam/Difference/Dual Wave Length Recording Spectrophotometer UV - 300 durchgeführt, ein Spectral data processor (Sapcom 1, Shimadzu) half, die aufgezeichneten Spektren zu

interpretieren. Proben der hergestellten Entkoppler wurden in n/10 NaOH gelöst ($\text{pH} \approx 13$), die Absorption über einen Bereich von 500 bis 300 nm gemessen. Die Spaltbreite betrug 1 nm. Aus bekannter Konzentration und Küvettendurchmesser konnte ϵ im Bereich der maximalen Absorption bestimmt werden.

2.3.2. Photometrische Bestimmung des pK-Werte

[Albert und Serjant (101), Hanstein (100)]

Die pH-Abhängigkeit der Absorption von Phenolderivaten wurde ausgenutzt, um am Hitachi Photometer (Modell 101) bei 450 nm die pK-Werte (= negativ dekadischer Logarithmus der Ionisationskonstanten) der Entkoppler HE-DNP und AE-DNP zu bestimmen. Verdünnte wässrige Lösungen der Entkoppler wurden mit n/10 HCl auf ungefähr pH 2 eingestellt und die Extinktion der nunmehr fast farblosen Lösung in einer 3 ml-Küvette gegen n/10 NaOH gemessen. Mit Hamilton Mikroliterspritzen wurde schrittweise 3n NaOH zugeführt, pH-Wert und Extinktion aufgezeichnet, bis bei etwa pH 12 die maximale Extinktion erreicht war. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergab sich der jeweilige pK-Wert bei $E_{\text{max}}/2$.

2.3.3 Esterhydrolyse

4mg AE-DNP wurden in 4 ml n/10 NaOH gelöst und für 30 min im Wasserbad bei 90-100°C erhitzt. Nach Abkühlen wurde mit 0,1 n HCl angesäuert und die Substanz mit 3 ml Äther (Fluka, p.A.) extrahiert. Proben wurden auf Kieselgel Dünnschichtplatten aufgetragen und analog dem in 2.2.2.2 beschriebenen Dünnschichtchromatographieverfahren entwickelt. Zur Kontrolle wurde der Vorgang ebenfalls mit HE-DNP durchgeführt.

2.3.4 Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

[nach Hansch et al. (67)]

Gemessen wurde der Verteilungskoeffizient der neutralen Form [HA] des Entkopplers. Stammlösungen der Substanzen HE-DNP und AE-DNP wurden in drei Verdünnungsstufen ungefähr im Ver-

hältnis 10:5:2 hergestellt entweder durch Lösen einiger mg in n/10 NaOH und Auffüllen mit Wasser oder durch Verdünnen bereits so hergestellter Stammlösungen. Mit 1:10 verdünnter Perchlorsäure (aus 70-72% HClO_4) wurde angesäuert, bis ein pH von etwa 2 erreicht war. Die so gewonnene Entkopplerlösung (0,5 ml) wird zu 1-Octanol (0,5 ml; Merck, p.A.) in Mikro-Reagenzgläser gegeben und bei Raumtemperatur (21°C) 20 min auf dem Rotationsmischer (Eppendorf, Modell 3300 geschüttelt. Anschließend werden die Phasen in einer Tischzentrifuge (Christ, Mikrohämatokrit) in wenigen Sekunden rasch getrennt. 0,2 ml der unteren wässrigen Phase werden mit einer Hamilton Mikroliterspritze zu 0,8 ml n/10 NaOH in eine Küvette gegeben und die Entkopplerkonzentration am Hitachi 101 Photometer bei 450 nm (HE-DNP) bzw. 420 nm (AE-DNP) gegen n/10 NaOH gemessen. Von jeder Verdünnungsstufe werden drei Proben bestimmt. Der Entkopplergehalt der Octanolphase wird bestimmt, indem pro Micro test tube 0,4 ml Octanolphase zu 0,4 ml n/10 NaOH gegeben werden. Nach 30 min Schütteln auf dem Rotationsmischer und Trennung der Phasen durch kurze Zentrifugation befindet sich der Entkoppler als Anion nahezu vollständig in der wässrigen Phase. Die Konzentration wird wie vorher beschrieben photometrisch gegen n/10 NaOH gemessen. Zur Kontrolle wird der Gehalt von 0,2 ml eingesetzter Entkopplerlösung ebenfalls photometrisch bestimmt.

2.3.5 Untersuchung der spezifischen Bindung an Rattenlebermitochondrien

Gleichgewichtsbindungsexperimente mit dem radioaktiv markierten Entkoppler 2-Azido-4-nitrophenol (NPA) wurden nach Hanstein (58, 96, 100) durchgeführt. [^3H]NPA war im Labor in 6,08 mM Lösung vorhanden mit einer angegebenen spezifischen Radioaktivität von 21 mC/nmol (Feb. 1974), die wegen des ^3H -Zerfalls im Februar 1980 noch 15,39 mC/nmol betrug.

Frisch präparierte Rattenlebermitochondrien wurden mit einem Puffer aus 0,25 M Saccharose, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, auf einen Proteingehalt von 2 mg/ml verdünnt. Drei Proben dieser

Mitochondriensuspension (Volumen jeweils 13 ml) wurden als Ausgangsbasis für drei Meßreihen in abgestufter Weise 20 μ l, 50 μ l bzw. 100 μ l [^3H]NPA-Lösung (6,08 mM) zugesetzt.

Jede der Meßreihen bestand aus 12 Ansätzen in Mikro-Reagenzröhrchen und setzte sich wie folgt zusammen:

Röhrchen 1-12: 1,0 ml der jeweiligen [^3H]NPA-markierten Mitochondriensuspension

zusätzlich:

Röhrchen 1-5: HE-DNP (5, 10, 20, 50 bzw. 125 μ M entsprechend 1, 2, 4, 10 bzw. 25 μ l der 5 mM Entkopplerstammlösung)

Röhrchen 6-10: AE-DNP in der gleichen Weise

Röhrchen 11 und 12 dienten jeweils der Kontrolle (Leerwert).

Nach 10 min Inkubationszeit erfolgte die Antrennung des Proteins durch Zentrifugation in der Christ Mikrohämatokrit-Zentrifuge (2000 Upm $\hat{=}$ 1250 g). Alle Schritte erfolgten bei 0°C im Eisbad, die Zentrifugation im Kühlraum bei -20°C, da die Zentrifuge keine Kühlung besitzt.

Auswertung:

Die Bestimmung der Konzentration des freien NPA (NPA_f) erfolgte durch Ermittlung der spezifischen Radioaktivität des Überstandes mit spektrophotometrisch definiertem radioaktiven NPA als interner Standard. Das an Protein gebundene NPA (NPA_b) wurde mit Hilfe eines weiteren internen Standards ermittelt, d.h., die Zählausbeute wurde durch Zufügen von standardisiertem T_2O erhalten. Unter Berücksichtigung der spezifischen Radioaktivität von NPA konnte NPA_b errechnet werden. Die Zählausbeute betrug zwischen 14,7 und 18,2%.

Aufgetragen wurden zunächst NPA_b gegen die Entkopplerkonzentration (AE-DNP und HE-DNP), womit spezifische wie unspezifische Bindung an Protein gemeinsam erfaßt sind. Als Dixonplot wurde der reziproke Wert $1/\text{NPA}_b$ gegen die Konzentration von AE-DNP und HE-DNP aufgetragen, wobei der Anteil unspezi-

fischer Bindung des NPA vorher subtrahiert wurde. Abhängig von drei eingesetzten Konzentrationen NPA_f ergeben sich drei Geraden, deren Schnittpunkt im 4. Quadranten den negativen Wert der Inhibitorkonstanten des jeweiligen Entkopplers als Abszissenkoordinate ergeben.

Da man die Verdrängung des NPA durch andere Entkoppler aus der Proteinbindung mathematisch analog der kompetitiven Inhibierung einer Enzym-Substratbindung behandeln kann, können die Daten somit wie folgt analysiert werden.

$$v = V_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad (1),$$

wobei wir setzen:

$$\begin{aligned} v &= \text{NPA}_b \\ S &= \text{NPA}_f \\ V_{\max} &= \text{NPA}_{b,\max} \\ K_m &= K_D^{\text{NPA}}, \text{ Dissoziationskonstante für NPA} \\ K_i &= K_D^I, \text{ Dissoziationskonstante des verdrängenden Entkopplers} \\ I &= \text{Konzentration des verdrängenden Entkopplers.} \end{aligned}$$

Nach Umformung erhält man:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{S + K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{S} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{K_m}{S} + \frac{K_m I}{S K_i}\right) \quad (2).$$

Die Auftragung als Dixon-plot ($\frac{1}{v}$ gegen I) ergibt daher eine Gerade mit der Steigung

$$\frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{K_m}{K_i} \cdot \frac{1}{S}.$$

Bei $I = -K_i$ und $1/v = 1/V_{\max}$ schneiden sich alle zu den verschiedenen Werten gehörigen Geraden.

Secondary slope: Zur Berechnung von K_D für NPA werden die Steigungen des Dixon-plots (s.o.) gegen den reziproken Wert des freien NPA ($1/S$) jeweils für die eingesetzten Entkopppler HE-DNP und AE-DNP aufgetragen. Die Steigung der damit erhaltenen Geraden wird abgelesen und entspricht

$$\text{Sec. slope} = \frac{K_m}{K_i} \cdot \frac{1}{V_{\max}} \quad (3).$$

$V_{\max}$ und K_i können aus dem Dixon-plot entnommen werden und ergeben, in (3) eingesetzt, K_m , d.h. die Dissoziationskonstante K_D für NPA, die mit dem Literaturwert (100) verglichen werden kann.

BIOCHEMISCHER TEIL

2.4 Allgemeine Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode

Die Biuret-Methode (102) wurde in Gegenwart von Desoxycholat (103, 104) wie folgt durchgeführt:

Biuretlösung: 1,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
6,0 g NaK-Tartrat ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$)
in Mischung aus
500 ml A.dest. und
300 ml 10% NaOH gelöst
auf 1 l mit A.dest. aufgefüllt.

Testansatz: 1,5 ml Biuretlösung
0,03 ml 5% Desoxycholat
0,05 ml Proteinprobe
auf 3 ml mit A.dest. aufgefüllt,
gemischt, 40 sec im kochenden Wasserbad (Gerhardt, Type SV 24) auf 100°C erhitzt, abkühlen lassen und nach 15 min die Extinktion bei 540 nm bestimmt (Spektrophotometer: Hitachi Modell 101).

Für jede angesetzte Lösung wurde im Labor eine neue Eichgerade erstellt. Die Biuretlösung wurde dunkel bei $+4^{\circ}\text{C}$ in Plastik aufbewahrt. Das Testsystem erfaßt Proteinmengen von 0,35 - 3,5 mg im Probenvolumen. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin (Sigma) erstellt (Abb. 9).

2.4.2 Radioaktivitätsmessung

Wässrige radioaktive Proben im Bereich 0,2 - 2 ml wurden in Glas- bzw. Plastikzählköpfchen überführt und zu 10 ml Szintillationscocktail gegeben.

Szintillationscocktail:

100 g Naphthalin

5 g PPO

auf 1 l Dioxan

Die Absorption von Lichtquanten im sichtbaren Bereich durch die farbigen Entkoppler wurde durch Ansäuern mit 0,1 ml Eisessig unterdrückt.

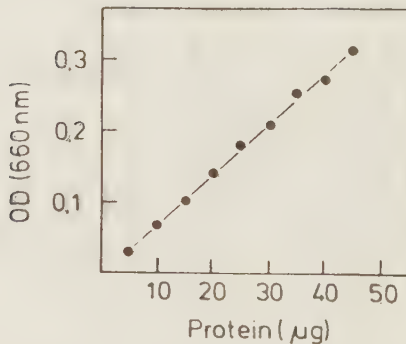


Abb. 9: Eichgerade, Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode mit Rinderserumalbumin (Sigma), Ordinate: optische Dichte bei 540 nm, Abszisse: Protein in mg im Test eingesetzt, Extinktionskoeffizient: 0,092/mg Protein/3 ml

Proteinhaltige Proben wurden in 0,5 ml 1M NaOH gelöst und mit zusätzlich 0,1 ml NaOH zum Auswaschen in Glaszählköpfchen überführt. Anschließend wurden 1 ml Soluene-100 (Packard) sowie 3 x 5 Tropfen H_2O_2 zugesetzt. Gezählt wurde je nach Aktivität für 1-10 min im Flüssig-Szintillationspektrometer (Packard Tri-Carb, Modell 3003) unter Lichtausschluß.

2.4.3 Präparation von Rattenlebermitochondrien

Rattenlebermitochondrien können in 2 bis 3 Stunden gewonnen werden, so daß nur geringe Änderungen der biochemischen Aktivitäten erwartet werden. Sie eignen sich somit für direkte, sofortige Messungen mit Wirkung auf den gesamten mitochondrialen Apparat. Ihre Haltbarkeit beträgt etwa weitere 6 Stunden, ohne daß RCR-Werte wesentlich abnehmen.

Analog der von Kaschnitz, Hatefi und Morris (105) verwendeten Methode wurde wie folgt vorgegangen:

Eine mit Äther anästhesierte weibliche Wistar Ratte (Gew. 240-280 g) wurde nach Eröffnung von Bauch- und Brusthöhle durch Schnitt ins Herz ausgeblutet, die Leber anschließend entfernt und sofort in Isolationsmedium gekühlt. Die Leber wurde gewogen (Lebergewicht = 1 Volumen), mit der Schere zerkleinert und in dreifacher Menge (3 Volumina) Isolationsmedium aufgenommen und mit dem Potter-Elvehjem anschließend dreimal zerkleinert.

Isolationsmedium:

220 mM Mannitol

70 mM Saccharose

2 mM HEPES

mit KOH auf pH 7,4 eingestellt.

1 mg Protease pro Gramm Leber wurde zugegeben und im Eisbad für 20 min gerührt. Danach wurden 3 Volumina 1% BSA in Isolationsmedium zugegeben, um Lipasewirkung zu verhindern und freie Fettsäuren und Schwermetalle zu binden, und noch einmal homogenisiert.

Anschließend erfolgte Zentrifugation in der Beckman L3-40 oder Wkf G421 Zentrifuge (Hitachi) für 1 Minute bei 6000 Upm (3200 g), um Zellkerne und Bindegewebe zu sedimentieren.

(Rotor: Beckman Type 30 Aluminium, $r = 105$ mm, Röhrchen:
5 x 30 ml Plastik)

Der Überstand wurde erneut zentrifugiert für 2 min bei 16000 Upm (17000 g).

(Rotor: Hitachi RP 65 T, $r = 80$ mm; Röhrchen:
10 x 9,5 ml Polycarbonat)

Die Pellets wurden vorsichtig in 3 Volumina Isolationsmedium aufgenommen, wobei darauf geachtet wurde, daß weder Fettbestandteile am Rand noch Blutreste am Grunde des Pellets mitgenommen wurden. Im kleinen Glaskolben wurden sie mit der Hand homogenisiert und erneut bei 15000 Upm für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in möglichst wenig Isolationsmedium aufgenommen, noch einmal homogenisiert und für die Versuche verwendet.

Während des gesamten Vorgangs wurde darauf geachtet, daß die Temperatur 4°C nicht überschritt. Proteinkonzentrationen lagen zwischen 50 und 70 mg/ml. Das Volumen betrug 3-5 ml, d.h. aus durchschnittlich 16-20 g Lebergewicht wurden ca. 200 mg Mitochondrien gewonnen.

2.4.4 Isolierung von Rinderherzmitochondrien

Rinderherzmitochondrien (beef heart mitochondria: BHM) wurden isoliert, modifiziert nach Smith (106), durch differentielle Zentrifugation. Vier Rinderherzen mit einem Gesamtgewicht von 8-10 kg werden etwa eine Stunde nach dem Tod der Tiere vom Schlachthof geholt und auf Eis gepackt. Im Kühlraum erfolgt die Weiterverarbeitung bei $+4^{\circ}\text{C}$, wobei alle Geräte vorgekühlt sind. Die Herzen werden zerkleinert, das Muskelgewebe von Blut, Sehnen, Fett und Bindegewebe befreit und gewürfelt. Im Fleischwolf erfolgt die weitere Zerkleinerung durch eine Scheibe mit 1,3 mm Porengröße. 300 g-Portionen des durchgetriebenen Materials werden im Verhältnis 1:3 (v/v) mit Isolationsmedium verdünnt.

Isolationsmedium:

250 mM Saccharose

10 mM Tris

1 mM Succinat

0,2 mM EGTA, pH 7,8 mit KOH eingestellt.

Es wird unverzüglich mit 2 M Tris-Base auf pH 7,8 wiedereingestellt. Das grob suspendierte Material wird im Mixer (Cenco) auf Stufe 2 (= 13 000 Upm in H₂O) homogenisiert, anschließend erfolgt pH-Kontrolle und Wiedereinstellung auf pH 7,8 mit 2 M Tris.

Das Homogenat wird für 10 min bei 20 000 Upm (12000 g) zentrifugiert, um Zellkerne und Bindegewebe zu sedimentieren. (Zentrifuge: Wkf G 50 K; Rotor: Wkf Alu 6 x 1000, r = 199 mm, 6 x 1000 ml Stahlbecher)

Der die Mitochondrien enthaltende, rötliche Überstand wird vorsichtig dekantiert, durch 3 Lagen Mull filtriert, um die schwimmende Fettschicht zurückzuhalten und mit dem dreifachen Volumen Isolationsmedium versehen.

Zentrifugation für 45 min bei 8000 Upm (15000 g) (Zentrifuge und Rotor s.o.) ergibt ein bräunliches, die Mitochondrien enthaltendes Pellet. Der Überstand wird verworfen, das Pellet vorsichtig in 800 ml Isolationsmedium aufgenommen und im Homogenisator (Potter S, B. Braun, Glas mit Teflonkolben) homogenisiert. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, daß Fettreste, die entkoppelnde Fettsäuren enthalten, nicht mit dem Pellet aufgenommen werden. Ebenso bleiben Blutreste am Boden des Zentrifugenbeckers ausgespart. Es wurde nicht zwischen gebrochenen (leichten) und intakten (schweren) Mitochondrien unterschieden (Blair, Ref. 107).

Das Homogenat wird erneut für 20 min bei 15 000 Upm (25000 g) zentrifugiert.

Zentrifugen: 1) Wkf 30s mit 6 x 100 Stahlrotor, r = 99 mm
und 6 x 100 ml Polycarbonatbechern
2) Beckman L3-40 mit 45 Ti Rotor, r = 104 mm
und 6 x 60 ml Polycarbonatbechern.

Das Pellet wird unter Aussparung von Fett und Blutresten in

0,25 M Saccharose aufgenommen, homogenisiert, der Proteingehalt bestimmt und auf 20-60 mg/ml eingestellt. Die Mitochondrien werden in flüssig N₂ schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -18°C gelagert. 8-10 kg Rinderherzen ergaben im Durchschnitt 3 kg Muskelgewebe. Daraus erhielt man ca. 6 g mitochondriales Protein.

2.4.5 Schallpartikel nach Löw und Vallin (108)

Schallpartikel besitzen gegenüber Mitochondrien den Vorteil, daß aufgrund der nach außen gekehrten inneren Membran alle dort verankerten Enzyme für zugefügte, auch hydrophile Reaktanden zugänglich sind.

Die Gewinnung erfolgt durch differentielle Zentrifugation. Ungefähr 100-150 ml Rinderherzmitochondrien in 0,25 M Saccharose wurden langsam im kalten Wasser aufgetaut, in der gleichen Menge 0,25 M Saccharose aufgenommen und von Hand (Glas mit Teflonkolben) homogenisiert. Anschließend erfolgte Zentrifugation in der Sorvall Superspeed Zentrifuge für 30 min bei 20000 Upm (35000 g).

(Rotor: SS 34, r = 160 mm; Röhrchen: 8 x 40 ml Plastik). Auf diese Weise wurden beim Gefriervorgang geplatzte Mitochondrien im Überstand getrennt.

Das Pellet wurde in Puffer (0,25 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) aufgenommen und von Hand homogenisiert. Der Proteingehalt wurde nach der Biuret-Methode bestimmt, das Volumen des Homogenats gemessen und mit 1 n NaOH auf pH 7,8 eingestellt. Zugabe von 1 M MgCl₂ und 0,5 M ATP erfolgten in der Menge, daß 15 mM MgCl₂ und 1 mM ATP-Konzentration erreicht wurden.

Die Beschallung erfolgte im Kochsalz-Eisbad, um Erwärmung zu vermeiden, mit einem Branson Sonifier auf höchster Stufe. Beschallt wurden Portionen von 40-50 ml in Perioden von 6 x 10 sec, unterbrochen durch je 2 sec Pause. Der Vorgang wurde anschließend noch einmal wiederholt. Nach Beendigung wurde der pH-Wert kontrolliert und, sofern pH 7,5 unterschritten war, erneut auf pH 7,8 eingestellt.

Die Trennung der gewonnenen Partikel von übriggebliebenen Mitochondrien erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 15000 Upm (26300 g) analog der ersten Zentrifugation. Der Überstand wurde erneut in der Beckman L3-40 Zentrifuge für 90 min bei 30000 Upm (34200 g) zentrifugiert zur Sedimentation der Partikel.

(Rotor: Beckman Ti 45, $r = 104$ mm; Röhrchen: 4 x 92 ml Plastik).

Ergebnis: festes rötliches Pellet, das mit etwas Puffer herausgelöst und homogenisiert wurde. Nach Bestimmung des Proteingehalts konnten die Schallpartikel in 1-2 ml-Portionen in flüssig N_2 bei $-70^{\circ}C$ schockgefroren und bis zur Verwendung im Gefrierschrank bei $-18^{\circ}C$ aufbewahrt werden. Die Ausbeute betrug ungefähr 20% der eingesetzten Mitochondrien.

2.4.6 Schallpartikel nach Hansen und Smith (109)

Sie besitzen gegenüber der Präparationsmethode nach Löw und Vallin eine höhere spezifische Aktivität in allen energie-konservierenden Reaktionen. Ausbeute und Stabilität sind jedoch hierbei geringer.

Rinderherzmitochondrien (ca. 120 ml) wurden langsam in kaltem Wasser aufgetaut, in der gleichen Menge Saccharose-Tris-Acetat Puffer (STA-Puffer) aufgenommen (0,25 M Saccharose, 10 mM Tris, pH 7,4 mit Essigsäure eingestellt) und von Hand homogenisiert (Glas mit Teflonkolben). Im folgenden wurde analog 2.4.5 zentrifugiert, um die intakten Mitochondrien zu isolieren.

(Beckman L3-40 Zentrifuge; Rotor: Beckman 45 Ti, $r = 104$ mm; Röhrchen: 3 x 92 ml Plastik).

Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in STA Puffer gelöst, homogenisiert, Proteinkonzentration und Volumen bestimmt und mit STA Puffer auf 40 mg/ml Proteinkonzentration korrigiert.

Zugefügt wurden:

- 1 mM K-Succinat
- 1 mM ATP
- 5 mM $MgCl_2$
- 10 mM $MnCl_2$.

Der pH-Wert wurde vor der Beschallung mit 6 n KOH auf pH 7,6 eingestellt. Die Ultraschallbehandlung erfolgte analog 2.4.5 im Kochsalz-Eisbad, anschließend wurde der pH-Wert erneut reguliert (pH 7,6).

Die Abtrennung der nicht aufgebrochenen Mitochondrien geschah durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 Upm (22800 g) mit den oben erwähnten Hilfsmitteln.

Der Schallpartikel enthaltende Überstand wurde erneut für 70 min bei 35000 Upm (39900 g) in der Beckman L3-40 Zentrifuge zentrifugiert.

(Rotor: Beckman 45 Ti, $r = 104$ mm; Röhrchen: 3 x 70 ml

Polycarbonat).

Das geleeartige dunkelbraune Pellet wurde nach Abgießen des Überstandes vorsichtig mit STA-Puffer herausgelöst, von Hand homogenisiert und nach Bestimmung des Proteingehalts in 1-2 ml-Portionen sowie in eine Restportion aufgeteilt. Alle Portionen wurden in flüssigem Stickstoff bei -70°C schockgefroren und im Gefrierschrank bis zur Verwendung bei -18°C feuchtigkeitsgeschützt aufbewahrt.

Die Ausbeute betrug 600-700 mg Partikel aus ca. 6000 mg mitochondrialem Protein und somit 10-12%.

2.5 Messung des Einflusses von HE-DNP und AE-DNP auf Energieabhängige Reaktionen in Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln

2.5.1 Polarographische Messung der Atmungskontrolle in Rattenlebermitochondrien

Die polarographischen Messungen an RLM erfolgten nach Hanstein (96). Ebenso sei auf Estabrook (110) verwiesen.

Sauerstoffelektrode nach Clark

Das Gerät zur polarographischen Messung der Sauerstoffkonzentration besteht aus einer Pt-Elektrode (Kathode) und

einer Ag/AgCl-Elektrode, die zusammen von einer KCl-Lösung umgeben sind. Durch eine sauerstoffdruchlässige Teflonmembran sind beide Elektroden von der Reaktionslösung getrennt (Abb. 10). Eine Polarisationsspannung (ca. 0,6 V) läßt allen Sauerstoff, der sich in Nähe der Pt-Elektrode befindet, sich abscheiden. Die Teflonmembran wird dünn gehalten, um die Diffusionswege zu verringern, so daß die Clark-Elektrode schnell auf Änderungen der O_2 -Konzentration reagiert. Zusätzlich wird die Reaktionslösung gerührt.

Versuchsaufbau

Eine Glaskammer, die das Reaktionsgefäß und die Clark-Elektrode enthält, wird von einem Thermostat mit Umlaufpumpe (Colora Ultra Thermostat) auf 30°C temperiert (Abb. 10). Ein Kompensationsschreiber (Servogor, Typ RE 521) registriert nach Umformung von Strom in Spannung die an der Clark-Elektrode gemessene O_2 -Konzentration. Jeweils vor Versuchsbeginn wird in der Versuchskammer probeweise aller vorhandene Sauerstoff in der Lösung durch Zugabe von $Na_2S_2O_4$ (Natriumdithionit) reduziert und der so erhaltene Wert für $O_2 = 0$ auf der Skala des Schreibers markiert. Anschließend erfolgt durch Feinregulierung der Polarisationsspannung die Einstellung auf den Sauerstoffgehalt von 23°C warmen Wasser. Dazu wurde bei Raumtemperatur luftgesättigtes A.dest. (250 nmol O_2 /ml) verwendet, das ohne O_2 -Verlust auf 30°C gebracht wurde. Mit Hilfe dieser Eichung und unter Bezugnahme auf Literaturwerte (110) lassen sich die Anteile verbrauchten Sauerstoffs bei Berücksichtigung von Volumen und Temperatur bestimmen. Um nach Versuchsbeginn Kontakt mit der Außenluft zu vermeiden, wird ein Glasstopfen auf die Kammer gesetzt, durch den noch mit einer Hamilton Mikroliterspritze Reagentien addiert werden können. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich keine Luftbläschen im Gefäß selbst festsetzten, die den Reaktionsablauf beeinflussen hätten. Die Teflonmembran selbst wurde immer feucht gehalten. Lipophile Substanzen wurden nur kurz mit Methanol ausgewaschen, um die Membran weitgehend zu schonen.

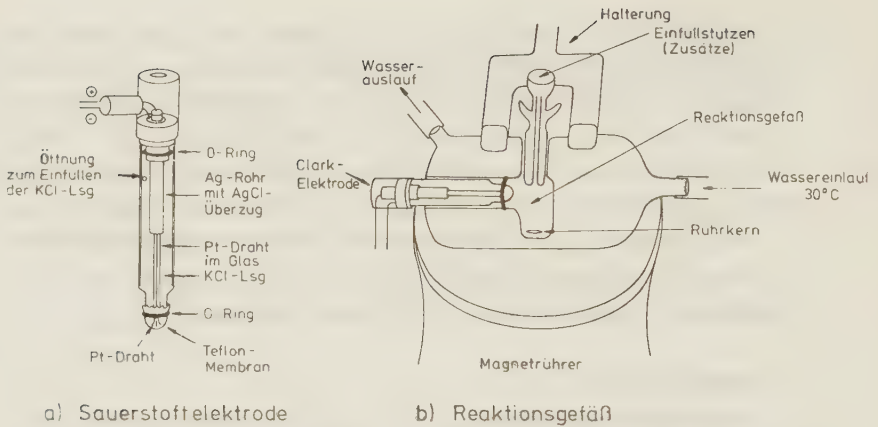


Abb. 10: Aufbau der Sauerstoffelektrode nach Clark sowie des Reaktionsgefäßes

Messung der Succinat-getriebenen Atmungskontrolle in Rattenlebermitochondrien:

Der Versuch wurde bei 30°C durchgeführt. In die Glaskammer (Volumen 1,76 ml) wurden gegeben:

- 1,70 - 1,72 ml des unten beschriebenen Succinat-RCR-Puffers,
- 20 - 50 µl RLM (25 - 50 mg/ml $\hat{=}$ 1-2 mg Protein pro ml im Ansatz,
- 5 µl Rotenon (1 mg/ml in Äthanol) zur Blockierung der Atmungskette in Komplex I.

Nach Verschluss der Kammer wird eine Stabilisationszeit von 30 sec abgewartet = state 4-Atmung; anschließend die mitochondriale Atmung durch Zugabe einer begrenzten Menge ADP (300 µmol ADP $\hat{=}$ 3 µl einer 0,1 M ADP Lösung) stimuliert = state 3-Atmung. Nach Wiedererreichen von state 4 wurden Entkoppler in Mengen von 50 - 500 nmol (HE-DNP) bzw. 5 - 50 nmol (AE-DNP) zugegeben und die Stimulation der Atmung am Schreiber verfolgt.

Zusammensetzung des Succinat-RCR-Puffers:

0,25 M Saccharose
10 mM K-Phosphat ($\text{KHPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$)
5 mM MgCl_2
10 mM KCl
3 mM K-Succinat

pH 7,4 wurde durch Kombination einer 0,1 M KHPO_4 -Lösung sowie der gleichen Lösung KH_2PO_4 im Verhältnis 6 : 1 erreicht, mit 3 n NAOH anschließend genau eingestellt.

Messung der β -Hydroxybutyrat- (BOXY-) getriebenen Atmungskontrolle in Mitochondrien:

Der Versuch wurde bei 30°C durchgeführt.

Versuchsansatz:

1,70 ml BOXY-Puffer (Zusammensetzung s.u.)
50 μl RLM (50 - 55 mg Protein/ml $\hat{=}$ 1 - 2 mg im Ansatz)

Nach 30 sec erfolgt Stimulation der Atmung durch 300 nmol ADP (state 3), anschließend, nach Erschöpfung des ADP, wird state 4-Atmung aufgezeichnet. Entkoppler werden in den oben beschriebenen Mengen zugesetzt, ADP in der gleichen Weise noch einmal zugeführt und state 3u und state 4u im weniger gekoppelten Zustand registriert.

Zusammensetzung des BOXY-Puffers:

0,25 M Mannitol
10 mM K-Phosphat ($\text{KHPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$)
5 mM MgCl_2
20 mM KCl
20 mM DL-3Hydroxybutyrat

pH 7,4 wurde wie oben beschrieben festgestellt.

2.5.2 Reverser Elektronentransport in submitochondrialen Partikeln (98)

Reaktionsablauf: Durch KCN wird die Atmungskette in Komplex IV gehemmt. Bei Zugabe von ATP wird unter Verbrauch von energiereichem Phosphat ein Elektronentransport entlang der At-

mungskette von Succinat zum NAD gewährleistet. Das sich bildende NADH wird photometrisch bei 366 nm (Hg-Filter) abhängig von der Zeit gemessen.

Aufbau des Versuchs: Für die reaktionskinetischen Messungen benutzt wurde ein Eppendorf 1101 M Photometer mit einem beweglichen Küvettenwagen. Der Küvettenwagen wurde von einem Haake-Thermostat mit Umlaufpumpe temperiert. Ein an das Photometer angeschlossener W+W Recorder 4301 zeichnete die NADH-Zunahme als Extinktion auf der Basis der Zeit auf. Die Versuchstemperatur betrug 30°C. Mit Hilfe von Glasloops lassen sich nachträglich zugefügte Substanzen in der Glasküvette rasch und gleichmäßig verteilen.

Versuchsansatz: eine 1 ml-Glasküvette wird beschickt mit:

0,97 ml REF-Puffer (s.u.)

5 µl KCN einer 0,5 M Lösung in A.dest.

5 µl NAD einer 50 mM Lösung in A.dest.

Zusammensetzung des REF-Puffers (reverse elecron flow)

0,25 M Saccharose

12,5 mM Mg-Acetat

3,6 mM Succinat

50 mM Glycylglycin

pH 8,0 mit 0,1 n NaOH eingestellt.

Die Küvette wird im Wagen auf 30°C erwärmt, anschließend werden 1-2 mg SMP (10 µl) addiert. Es folgen 2 min Inkubationszeit, um die Succinatdehydrogenase zu aktivieren. Start der Reaktion mit 3,4 mM ATP (10 µl einer 0,34 M Lösung). Nach weiteren 1,5-2 min erfolgt die Zugabe von HE-DNP, AE-DNP, NPA oder DNP in unterschiedlichen Mengen. Aus dem Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten jeweils vor und nach Entkopplereinsatz wird das Ausmaß der Inhibierung in % bestimmt (internal standard).

2.5.3 Messung der Transhydrogenaseaktivität in submitochondrialen Partikeln [nach Ernster (116)]

Die Transhydrogenase katalysiert einen reversiblen Hydridionentransfer zwischen reduzierten und oxidierten Formen des NAD und NADP.



Durch Succinatoxidation oder ATP-Hydrolyse wird in SMP ein elektrochemischer Protonengradient geschaffen, der die treibende Kraft der Transhydrogenasereaktion darstellt. Im Versuch wird dabei zugesetztes NADH oxydiert und der Wasserstoff auf NADP übertragen. Glutathion und Glutathionreduktase werden hinzugefügt, um NADP zu regenerieren, Rotenon, um die NADH-Oxidase in der Atmungskette zu blockieren. Die abnehmende NADH-Konzentration wird photometrisch bei 366 nm (Hg-Filter) abhängig von der Zeit gemessen.

Energiegetriebene Transhydrogenasereaktion:

Arbeitsgeräte wurden wie unter 2.5.2 angegeben verwendet. Teile der Versuchsreihe wurden am Shimadzu Spektrophotometer UV-300 bestimmt. Die Versuchstemperatur betrug 30°C. Im Versuch wurde ein Puffer (Transhydrogenase-Puffer) aus

200 mM Saccharose,
50 mM Tris - H₂SO₄, pH 7,5 und
10 mM MgSO₄ verwendet.

Versuchsansatz: eine 1 ml-Glasküvette wird beschickt mit:

0,95 ml Transhydrogenasepuffer
5 µl Rotenon (1 mg/ml in Äthanol)
10 µl NADH einer 50 mM Lösung
5 µl NADP einer 50 mM Lösung
10 µl 0,1 M oxidiertes Glutathion
10 µl Glutathionreduktase 1:4 verd. auf 50 U/ml

Nach Temperatúrausgleich werden 1 - 2 mg SMP (10 µl) addiert. Das Medium enthält somit 0,5 mM NADH, 0,25 mM NADP, 1 mM oxid. Glutathion, 0,5 U/ml Glutathionreduktase sowie 0,2 - 0,4 mg/ml SMP und 5 µg/ml Rotenon.

Nach 2 min Inkubationszeit = Nullaktivität wird mit 2 - 2,5 mM ATP oder 4 - 5 mM Succinat die Transhydrogenase aktiviert. Entkopplerzugabe erfolgte nach 1 - 1,5 min, sobald die Reaktionsgeschwindigkeit konstant war.

Aus dem Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten vor und nach Entkopplerzusatz jeweils vermindert um die Nullaktivität wurde das Ausmaß der Inhibierung der energiegetriebenen Transhydrogenase in % bestimmt (internal standard), ferner die Enzymaktivität in $\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ errechnet. Getestet wurden die Entkoppler HE-DNP, AE-DNP, NPA und DNP in unterschiedlichen Mengen.

Nicht-energiegetriebene Transhydrogenase:

Versuchsaufbau und -ansatz sind identisch mit der vorher beschriebenen Weise. Nach Zugabe von 5 μg Oligomycin (5 μl einer Oligomycinlösung in Äthanol mit 1 mg/ml) und 1 - 2 mg SMP wird zunächst die Nullaktivität registriert. Nach 2 min werden successiv HE-DNP, AE-DNP, NPA oder DNP zugesetzt. Die prozentuale Inhibierung ergibt sich aus dem Verhältnis der beiden Reaktionsgeschwindigkeiten.

2.5.4 Succinat-getriebene Atmung in Schallpartikeln

Der Einfluß von Entkopplern auf die Succinatoxidase in SMP wurde unter Bedingungen der Transhydrogenasereaktion (s. 2.5.3) gemessen. Die Messung erfolgte an der Clark-Elektrode (s. 2.5.1) bei 30°C.

Versuchsansatz: in das Reaktionsgefäß wurden gegeben:

- 1,74 ml Transhydrogenasepuffer
- 10 μl Rotenon (1 mg/ml in Äthanol)
- 10 μl SMP (Löw & Vallin, 51 mg/ml)

Durch Zugabe von 2,8 mM Succinat (5 μl einer 1 M Lösung) wird state 3-Atmung induziert. Die Entkoppler AE-DNP, HE-DNP, NPA und DNP werden 2 min später, nachdem die Atmungsgeschwindigkeit konstant ist, in unterschiedlichen Mengen zugesetzt. Ausgewertet wird die prozentuale Stimulierung in Bezug zur Anfangsgeschwindigkeit.

2.5.5 NADH-getriebene Atmung in Schallpartikeln

Der Versuch wurde unter Bedingungen der Transhydrogenasereaktion durchgeführt (s. 2.5.3). Die Messung erfolgte an der Clark-Elektrode (s. 2.5.1) bei 30°C.

Versuchsansatz: in das Reaktionsgefäß wurden gegeben:

1,74 ml Transhydrogenasepuffer

5 µl SMP (Löw & Vallin, 41 bzw. 51 mg/ml)

Durch Zugabe von 0,85 mM NADH (30 µl einer 500 mM Lösung) wird state 3-Atmung induziert. Sobald die Atmung konstant verläuft, etwa nach 2 min, werden die Entkoppler AE-DNP, HE-DNP, NPA oder DNP in unterschiedlichen Konzentrationen addiert. Ausgewertet wird die prozentuale Stimulierung in Bezug zur Anfangsgeschwindigkeit.

2.5.6 Messung der Aktivität der F₁-ATPase

Die Messung erfolgt nach Pullman, Penefsky et al. (112) an den unter 2.5.2 beschriebenen Arbeitsgeräten. Die Versuchstemperatur betrug 30°C. Bedingungen der Transhydrogenasereaktion (s. 2.5.3) wurden so weit wie möglich eingehalten.

Reaktionsablauf: Die F₁-ATPase katalysiert die folgende Reaktion:



Hydrolysiertes ATP läßt sich nach folgender Reaktion wieder regenerieren (Substratphosphorylierung):



PEP = Phosphoenolpyruvat

Pyruvat wird durch zugesetzte Lactatdehydrogenase (LDH) in Gegenwart von NADH₂ reduziert.



Gemessen wird die photometrische Abnahme von NADH₂ pro Zeit-

Gegenwart von 0,5 ml 0,2 M MgCl_2 in Austausch gebracht und mit 5 ml 7,5 n NH_4OH zweimal ausgefällt, wobei jedesmal das Sediment für 5 min in der Tischzentrifuge (Christ) abzentrifugiert und jeweils das Pellet mit etwa 1 ml verbleibendem Überstand für den nächsten Vorgang weiterverwendet wurde. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 1 n $\text{HCl}/20 \text{ mM } \text{MgCl}_2$ gelöst und der obige Vorgang noch einmal wiederholt. Das daraus resultierende Pellet wurde wieder entsprechend gelöst und in Dowex 50 H^+ (Fluka) aufgenommen, bis die Lösung klar wurde (ca. 5 ml), noch einmal zentrifugiert und eine 20 μl -Probe gezählt. Die anfänglich zugesetzte Menge an Radioaktivität war dabei so bemessen, daß etwa 10^6 cpm/ml am Ende zur Verfügung standen.

Für die ATP- $^{33}\text{P}_i$ -Austauschreaktion wurde folgender Cocktail benutzt:

Cocktail: 10 ml enthalten

0,6 ml 1 M MgSO_4 in H_2O

0,4 ml K-Phosphatpuffer (50 mM), pH 7,4

9,0 ml STA-Puffer (0,25 M Saccharose, 10 mM Tris-Aacetat
Puffer, pH 7,4)

Kleine Reagenzgläser wurden beschickt mit:

0,5 ml Cocktail

20 μl $^{33}\text{P}_i$ (10^6 cpm/ml)

20 μl SMP (L $\ddot{\text{o}}$ w & Vallin, mit STA-Puffer 1:8 auf 5 mg/ml
verdünnt)

Die Entkoppler HE-DNP oder AE-DNP wurden in gewählten Mengen zugesetzt und mit STA-Puffer auf ein Volumen von 0,98 ml aufgefüllt.

Nach Äquilibrieren auf die Versuchstemperatur von 30°C im Wasserbad (Colora Ultra Thermostat) wird in 30 sec Abständen der Phosphataustausch mit 10 mM (20 μl einer 0,5 M Lösung) gestartet und nach genau 2 min 0,1 ml 35% Perchlorsäure gestoppt und auf Eis gesetzt. Das Protein wird in einer Tischzentrifuge (Christ) abzentrifugiert und wiederum auf Eis gesetzt, um ATP-Hydrolyse zu verhindern.

Extraktion:

- 0,5 ml Überstand,
- 4,0 ml 1,25 n Perchlorsäure,
- 5,0 ml 1:1 Gemisch Isobutanol/Benzol und
- 1,0 ml 5% Ammoniummolybdat

werden in ein Reagenzglas zusammengegeben und zweimal für 20 sec geschüttelt. Es bilden sich zwei Phasen. Ammoniummolybdat bildet mit anorganischem Phosphat Komplexe, die sich in der oberen organischen Phase lösen. Die obere Phase wird abgesaugt und verworfen, der Vorgang noch einmal wiederholt und zum Schluß das restliche Ammoniummolybdat mit 2 ml Äther extrahiert. Die zurückbleibende wässrige Phase enthält nun AT^{33}P . 2 ml davon werden zu 10 ml Szintillationsmedium in Plastikzählköpfchen gegeben (s. 2.4.2) und für 1 bzw. 5 min gezählt. Als Kontrolle dient ein Nullwert ohne Enzymreaktion sowie ein Maximalwert ohne Entkopplerzusatz. Ausgewertet wird die prozentuale Inhibierung des ATP-P_i -Austausches durch AE-DNP und HE-DNP.

2.5.8 Sauerstoffpulseexperimente an Rattenlebermitochondrien

Der Sauerstoffjump an RLM wurde analog Archbold, Farrington et al. (114) gemessen.

Reaktionsablauf: Eine anaerobe, substrathaltige Mitochondrien-suspension wird durch Zugabe von O_2 -haltiger Lösung zur Atmung stimuliert, wobei ein H^+ -Gradient entlang der inneren Membran, von der Cytosolseite zur Matrixseite, aufgebaut wird, der das Medium etwas saurer werden läßt. Nach vollständiger Reduktion von O_2 baut sich der Gradient einer Exponentialfunktion folgend ab. Entkoppler können das Ausmaß der Protonenwiederaufnahme beeinflussen.

ΔH^+ -Messungen wurden durchgeführt in einer thermostatisch kontrollierten zylindrischen Glaszelle von 2 ml Inhalt, die eine H^+ -sensitive Glaselektrode (Beckman Kombinationselektrode Typ 39045) und eine gesättigte Kaliumchloridbrücke, die zu einer Referenzelektrode führt, enthält. Beide Elektroden sind an ein pH-Meßgerät (Ion Meter 600, Metrohm Herisau) gekop-

pelt: Ein Servogar Schreiber zeichnet die pH-Veränderungen in der Reaktionslösung im 5 oder 10 mV-Bereich gegen die Zeit auf. Ein Magnetrührer hält die Lösung ständig in Bewegung. Ein Glaspiston verschloß das Gefäß. Nur durch eine schmale Öffnung konnten mit einer Hamilton Mikroliterspritze die Pulsexperimente durchgeführt werden. Es wurde Sorge getragen, daß anaerobe Verhältnisse aufrecht erhalten wurden, indem alle verwendeten Lösungen einschließlich der Entkopplerlösungen vor der Verwendung mit N_2 -Gas mehrere Minuten entlüftet wurden. Während der Messung wurde die Mitochondrien-suspension an der Oberfläche ständig mit N_2 umspült, um Zutritt von Luftsauerstoff zu verhindern. Alle Messungen wurden bei pH 7,2 - 7,3 bei $30^\circ C$ durchgeführt. Als Basismedium diente folgender schwacher Puffer:

220 mM Mannitol

70 mM Saccharose

2 mM HEPES-KOH Puffer, pH 7,4

Die zugesetzten Lösungen wurden auf pH 7,3 eingestellt.

Versuchsansatz: in das Reaktionsgefäß wurden gegeben:

1,8 ml Basismedium

0,2 ml RLM ($54 \text{ mg/ml} \approx 5,4 \text{ mg/ml}$ Protein im Ansatz)

20 μl 1 M K-Succinat

10 μl Rotenon (1 mg/ml in Äthanol)

1 - 30 μl Entkoppler (4,97 mM HE-DNP oder 5,33 mM
AE-DNP in H_2O)

Nach 3 min Inkubationszeit werden 80 μl O_2 -haltige 0,25 M Saccharoselösung rasch injiziert und der Sauerstoffjump aufgezeichnet. Als Kontrolle dienen Sauerstoffpulsexperimente ohne Entkoppler.

2.5.9 Substratpulsexperimente an submitochondrialen Partikeln

Die Versuche wurden nach Hanstein (96) durchgeführt.

Reaktionsablauf: Durch Injektion von NADH als Substrat wird in einer aeroben Suspension von SMP die Atmung induziert und ein Protonengradient von innen nach außen aufgebaut, wodurch

das umgebende Medium schwach alkalisiert wird. Durch Abnahme von NADH baut sich der Gradient in exponentieller Weise wieder ab. Zugeseetzte Entkoppler beschleunigen dabei die Protonenwiederaufnahme durch das Medium um ein Vielfaches abhängig von der Konzentration.

Der Versuchsaufbau und die zur Messung benötigten Arbeitsgeräte sind in 2.5.8 beschrieben mit der Ausnahme, daß wegen der aeroben Bedingungen kein N_2 -Gas benötigt wird. Ein Basismedium aus

- 150 mM KCl,
- 3,3 mM Glycylglycin-KOH Puffer, pH 7,4 und
- 5 mM $MgCl_2$

wird eingesetzt, um eine schwache Pufferung zu erwirken. Versuche wurden bei $30^{\circ}C$ durchgeführt, wobei nach Zugabe aller Reagentien pH 7,2 - 7,3 vorherrschte.

Versuchsansatz: in das Reaktionsgefäß wurden gegeben:

- 1,92 ml Basismedium
- 5 μ l Oligomycin (1 mg/ml in Äthanol)
- 2 μ l Valinomycin (1 mg/ml in Äthanol)
- 50 μ l SMP (Hansen & Smith, 64 mg/ml)
- 1 - 40 μ l Entkoppler (4,97 mM HE-DNP oder 5,33 mM AE-DNP in H_2O)

Oligomycin diente dazu, die ATPase zu inhibieren und somit die H^+ -Kanäle zu schließen; Valinomycin, um im Zusammenhang mit K^+ ein entstehendes Membranpotential abzubauen. Nach 3 min Inkubationszeit werden 50 μ M NADH (2 μ l einer 50 mM Lösung in H_2O) rasch injiziert und die NADH-Jumps im 10 mV-Bereich aufgezeichnet. Als Kontrolle dienen Substratpulssexperimente ohne Entkoppler. Bei einer zweiten Meßreihe wurden 100 μ l zuge-setzte SMP (Hansen & Smith, 27 mg/ml $\hat{=}$ 1,35 mg/ml Protein im Snetz) mit nur 12,5 μ M NADH stimuliert, die Jumps im 5 mV-Bereich registriert.

2.5.10 Oxonol VI-Membranpotentialmessungen an Schallpartikeln

Der Farbstoff Oxonol VI - Bis (3-phenyl-5-oxoisoxazol-4-yl) pentamethimoxonol - ist in SMP ein guter Indikator eines elektrischen Membranpotentials (115) und war daher geeignet, die Wirkung von HE-DNP und AE-DNP auf $\Delta\psi$ näher zu erfassen. Atmung oder ATP-Hydrolyse verursachen eine Rotverschiebung im Absorptionsspektrum von Oxonol VI um 20 nm in Korrelation mit dem entstehenden Membranpotential. Entkoppler oder Ionophore (Valinomycin + K^+) bauen dieses Potential ganz oder teilweise ab, was durch den Rückgang der Spektralverschiebung deutlich wird. Oxonol VI wurde in diesem Labor synthetisiert aus 3-Propyl-5-(4H)isoxazolon (Aldrich Chem.) und Glutaconaldehyddianilid-hydrochlorid (K&K Laboratories) nach einer veröffentlichten Methode (116). Für Versuchszwecke wurde eine 1 mM Lösung in 100 mM Na_2SO_4 und 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 hergestellt. SMP (Löw & Valin, 41 mg/ml) wurden vorher 1:4 mit Saccharose-Tris-Cl Puffer (0,25 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) verdünnt. Alle Messungen wurden am Shimadzu Spectrophotometer UV-300 vorgenommen und die Absorptionsdifferenz 630 - 602 nm aufgezeichnet. Die Versuchstemperatur von 30°C wurde thermostatisch kontrolliert, Bedingungen der Transhydrogenasereaktion (s. 2.5.3) so weit wie möglich eingehalten.

Versuchsansatz: eine 1 ml-Glasküvette wurde beschickt mit:

0,99 ml Transhydrogenasepuffer

1 μ l 2 mM Oxonol VI (s.o.)

10 μ l SMP (10 mg/ml, s.o. = 0,1 mg/ml

Protein im Ansatz)

Nach Temperatúrausgleich wurde mit 5 mM ATP (5 μ l einer 0,5 M Lösung), 4 mM Succinat (4 μ l 1 M K-Succinatlösung) oder 0,5 mM NADH (10 μ l 50 mM Lösung) energetisiert und nach 30 - 40 sec das Oxonolsignal durch Zugabe von HE-DNP oder AE-DNP in Mengen von 10 - 250 μ M ($\approx$ 2 - 50 μ l 5,00 mM bzw. 5,1 mM Stammlösung) verringert. Ausgewertet wurde das Verhältnis $\Delta OD / \Delta OD_0$ der Oxonolantwort in Prozent.

2.5.11 Messung der Δ pH-abhängigen ACMA-Fluoreszenzänderung an Schallpartikeln

Δ pH-sensitive Fluoreszenzänderungen wurden mit den Spektrofluorimetern Fluorispec SF 100 (Baird-Atomic) und Aminco SPF 500 in Abänderung einer von Niewenhuis et al. beschriebenen Methode (117) gemessen. Atmung oder ATP-Hydrolyse verursacht in sub-mitochondrialen Partikeln vorübergehend eine Abnahme der Fluoreszenzrate des Farbstoffes ACMA (9-Amino-6-chloro-2-methoxy-acridin), die durch Nigericin + K^+ sofort rückläufig gemacht werden kann, während Valinomycin + K^+ kaum eine Änderung zeigen. Die ACMA-Antwort ist somit ein qualitativer Indikator für einen pH-Gradienten (118). 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin (ACMA) war eine Gabe von Dr. E.P. Bakker und war als 0,6 mM Lösung in Äthanol vorhanden. Fluoreszenzänderungen wurden bei 480 nm Emissions- und 410 nm Excitationswellenlänge verfolgt. Der Entkoppler TTFB (Tetrachlorotrifluoromethylbenzimidazol) war ebenfalls eine Gabe von Dr. E.P. Bakker in Form einer 1 mM Lösung in Äthanol und wurde zeitweilig an Stelle von HE-DNP und AE-DNP benutzt. Die Versuchstemperatur von 30°C wurde thermostatisch kontrolliert, Bedingungen der Transhydrogenasereaktion (s. 2.5.3), sofern möglich, eingehalten.

Versuchsansatz: eine 2,5 ml-Glasküvette wurde beschickt mit:

2,48 ml Transhydrogenasepuffer

2 μ l 0,6 mM ACMA in Äthanol

20 μ l SMP (Löw & Vallin, 41 mg/ml $\hat{=}$ 0,33 mg/ml

Protein im Ansatz)

Nach Temperatúrausgleich erfolgt Energetisierung mit 2 mM ATP (10 μ l 0,5 M Lösung) oder 4 mM Succinat (5 μ l 1 M Lösung). TTFB (8 μ M), HE-DNP oder AE-DNP (20 - 60 μ M) werden nach angemessener Zeit (ca. 1 min) zugesetzt, rasch verrührt und die Fluoreszenzzunahme am Schreiber verfolgt. Der Einfluß von Entkopplern auf die Fluoreszenzänderung wurde in Prozent bezogen auf die Fluoreszenzabnahme nach Energetisierung ausgewertet, wobei der Einfluß von ATP als auch der von HE-DNP und AE-DNP selbst berücksichtigt wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der chromatographischen Reinigung - Darstellung zweier neuer Entkoppler

Das bei der Nitrierung anfallende Rohprodukt ist chromatographisch nicht rein, vielmehr zeigten sich ca. 10-15 abgrenzbare Banden unterschiedlicher Nitrierungsprodukte. Im wesentlichen entstanden jedoch drei Fraktionen, die kristallin erhalten werden konnten, von denen sich zwei, nämlich die Substanzen HE-DNP und AE-DNP, als chemisch rein erwiesen. Abb. 11 zeigt das Laufverhalten von HE-DNP und AE-DNP in 2%, 5% und 10%igem Eisessig-Methylenchloridgemisch auf Dünnschichtchromatographieplatten mit den entsprechenden Retentionsfaktoren. Die erhaltene dritte Substanz, deren nähere Charakterisierung nicht möglich war, ist hierbei mit aufgeführt.

Die ersten beiden Synthesen vollzogen sich unter dem Gesichtspunkt der Herstellung des HE-DNP. Da jedoch hierbei größere Mengen einer zweiten Substanz in Form einer Vorlaufraction anfielen, wurde letztere ebenfalls aufbereitet und kristallin erhalten als AE-DNP. Trotz der unterschiedlichen Reaktionstemperatur während der Nitrierung von +2 °C (1. Synthese) und -15 °C (2. Synthese) konnte kein nennenswerter Unterschied in Hinblick auf das mengenmäßige Verhältnis der Endprodukte festgestellt werden.

Technisch bereitete die 3. Synthese die größten Schwierigkeiten, da eine Auftrennung des Rohproduktes von dreifacher Menge nur unter Verwendung von Chromatographiesäulen mit entsprechend großem Bettvolumen (1-1,5 l) möglich war mit entsprechender Elutionszeit von etwa 3 Tagen. Nach Trennung der ersten Fraktionen konnten in kleinerem Maßstab die einzelnen Banden aufbereitet werden. Die Ausbeute betrug bei der 3. Synthese bei Einsatz von 24 g Hydroxyphenethylalkohol bezogen auf 5 g HE-DNP 13% bzw. 6,5% bezogen auf etwa 3 g AE-DNP.

Als Lösungsmittel für die beiden Entkoppler eignen sich am besten die Reihenfolge

Aceton > Chloroform > Äthanol

Nur bedingt eignet sich Methanol, in Wasser lösen sich nur noch Spuren. Hingegen lassen sich in alkalischem Milieu (z.B. n/10 NaOH) bei längerem Rühren noch beträchtliche Mengen in Lösung versetzen. Insgesamt verhält sich AE-DNP hydrophober als HE-DNP.

Schmelzpunktbestimmungen ergeben für HE-DNP einen mittleren Wert von 108,5 °C (Einzelwerte: 108 °C, 109 °C, 108,5 °C), für AE-DNP einen Wert von 97,8 °C (Einzelwerte: 98,5 °C, 97,3 °C, 97,7 °C), womit die Entkoppler im Schmelzpunktverhalten einigen 2,4- bzw. 4,6-Dinitroalkylphenolen ähneln (99).

Die in kristalliner Form erhaltene dritte Substanz erwies sich bei wiederholter Dünnschichtchromatographie als ein Konglomerat aus zwei oder drei Substanzen mit fast identischen RF-Werten. Eine saubere säulenchromatische Auftrennung war auch mit 2% Eisessig in Methylenchlorid nicht möglich. Die Schmelzpunktanalyse ergab keinen einheitlichen Schmelzpunkt. Angefertigte MMR-Spektren im 60 MHz- und 80-MHz-Bereich bleiben unübersichtlich. Die Löslichkeit ist praktisch nur in Aceton gegeben, nur wenig in Äthanol. Eine probeweise Entkopplung der Succinat-getriebenen Atmungskontrolle in Rattenlebermitochondrien ließ eine Überlegenheit über AE-DNP erkennen.

Lösungen:

Für Versuchszwecke wurden genau abgewogene Mengen (3-5 mg) HE-DNP oder AE-DNP in 0,125 M K-Phosphatpuffer, pH 8,08 bzw. n/100 NaOH unter Rühren über Nacht gelöst, pH 7,6 mit 6n HCl eingestellt. Die Lösungen hielten sich bei +4 °C sehr stabil. Erst nach 9 bis 12 Monaten zeigten sich erste Hydrolyseerscheinungen der Acetylgruppe des AE-DNP, wobei auf Dünnschichtchromatographieplatten eine neue Zone in Höhe des HE-DNP zu sehen war. Die Lösungen wurden dann durch neue ersetzt.

Abb. 11: Dünnschichtchromatographie der hergestellten Entkoppler auf Kieselgel 60 DC Fertigplatten. Entwicklung im 2%igen (oberes), 5%igem (mittleres) und 10%igem (unteres Bild) Eisessig-Methylenchloridbad. Lösungsmittelfront entsprechend markiert. Die AE-DNP-Fraktion (unteres Bild), hier während der Reinigung der Substanzen, enthält noch geringe Mengen HE-DNP

3. Synthese	①		HE - DNP $R_f = 0.58$
	②	 	AE - DNP $R_f = 0.74$
	③		3. Substanz $R_f = 0.82$

1. + 2. Synthese	①		HE - DNP $R_f = 0.35$
	②		HE - DNP $R_f = 0.35$
	③		AE - DNP $R_f = 0.61$
	④		AE - DNP $R_f = 0.61$

3. Synthese	①		HE - DNP $R_f = 0.2$
	②		AE - DNP $R_f = 0.33$
	③		3. Substanz $R_f = 0.39$

3.2 Auswertung der strukturanalytischen Untersuchungen und spektralen Eigenschaften der Entkoppler

Elementaranalyse: Die auswärts ausgeführte Elementaranalyse bestätigte die für HE-DNP erwarteten prozentualen Anteile an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff (s. Tabelle 1).

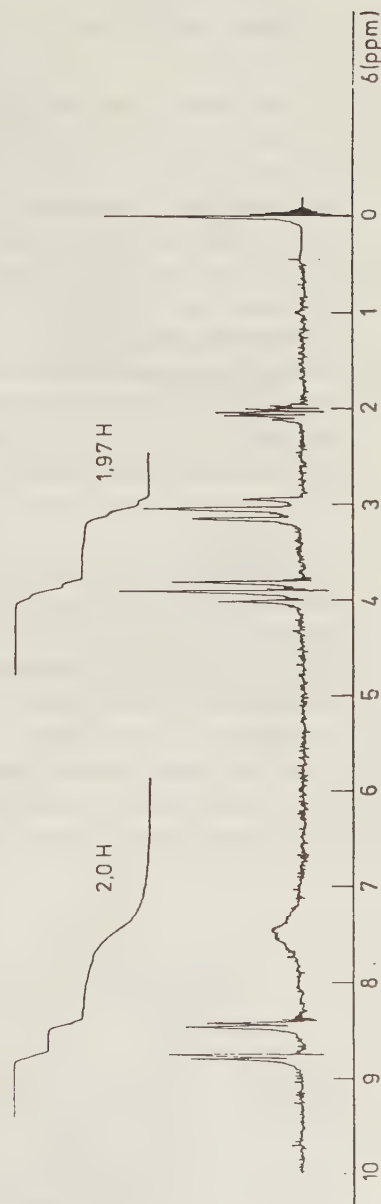
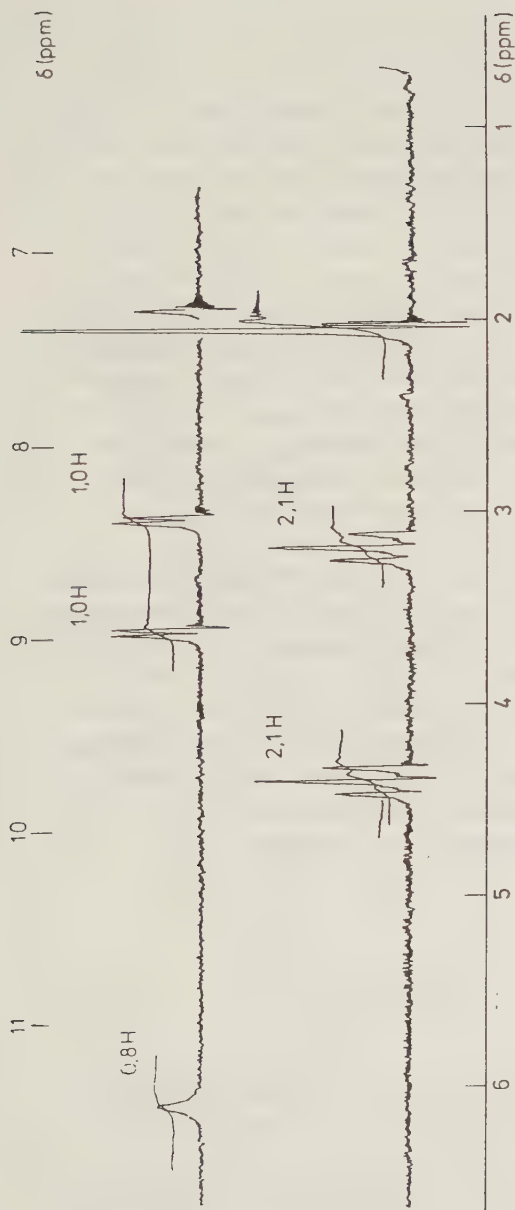
Tabelle 1: Elementaranalytisch bestimmter Gehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff des HE-DNP in Prozent

	erwarteter Anteil:	elementaranalytisch bestätigt:
C:	42,11 %	42,18 %
H:	3,53 %	3,48 %
N:	12,28 %	12,23 %

NMR-Spektroskopie: Das bei 60 MHz durchgeführte NMR-Spektrum für HE-DNP (Abb. 12) weist nach Integration insgesamt 8 Protonen auf. Jeweils zwei bei $\delta = 3,05$ und $\delta = 3,91$ gehören zu den erwarteten beiden Methylengruppen der Seitenkette, die in Triplettts gespalten sind. Die beiden am aromatischen Ringsystem verbliebenen Protonen finden sich bei $\delta = 8,44$ in 5-Position und bei $\delta = 8,77$ in 3-Position, jeweils in Duplettts gespalten. Die in 2'- und 5-Position erwarteten Hydroxylgruppen erscheinen als eine breite einheitliche Absorptionsbande bei $\delta = 7,5$, ihre Integration zeigt zwei Protonen an. Bei $\delta = 7,04$ absorbiert das verwendete Lösungsmittel Deuteroacetone in Form eines Multipletts. Die Absorption der Eichsubstanz Tetramethylsilan (TMS) liefert die Position $\delta = 0$.

Die Kopplungskonstanten ergeben die für Ringprotonen erwarteten Werte von $J = 3$ Hz und $J = 6$ Hz für die Methylengruppen der Seitenkette. Zusammen mit dem Ergebnis der Elementarana-

Abb. 12: NMR-Spektren der Substanzen AE-DNP und HE-DNP. Oberes Spektrum: AE-DNP in $CDCl_3$ gelöst. Aufnahme bei 90 MHz; TMS als Referenzsubstanz (nicht dargestellt). Spektrum zur Darstellung übereinandergeschoben. Unteres Spektrum: HE-DNP in $(CD_3)_2CO$ gelöst. Aufnahme bei 60 MHz gegen TMS als Referenzsubstanz ($\delta = 0$ ppm)

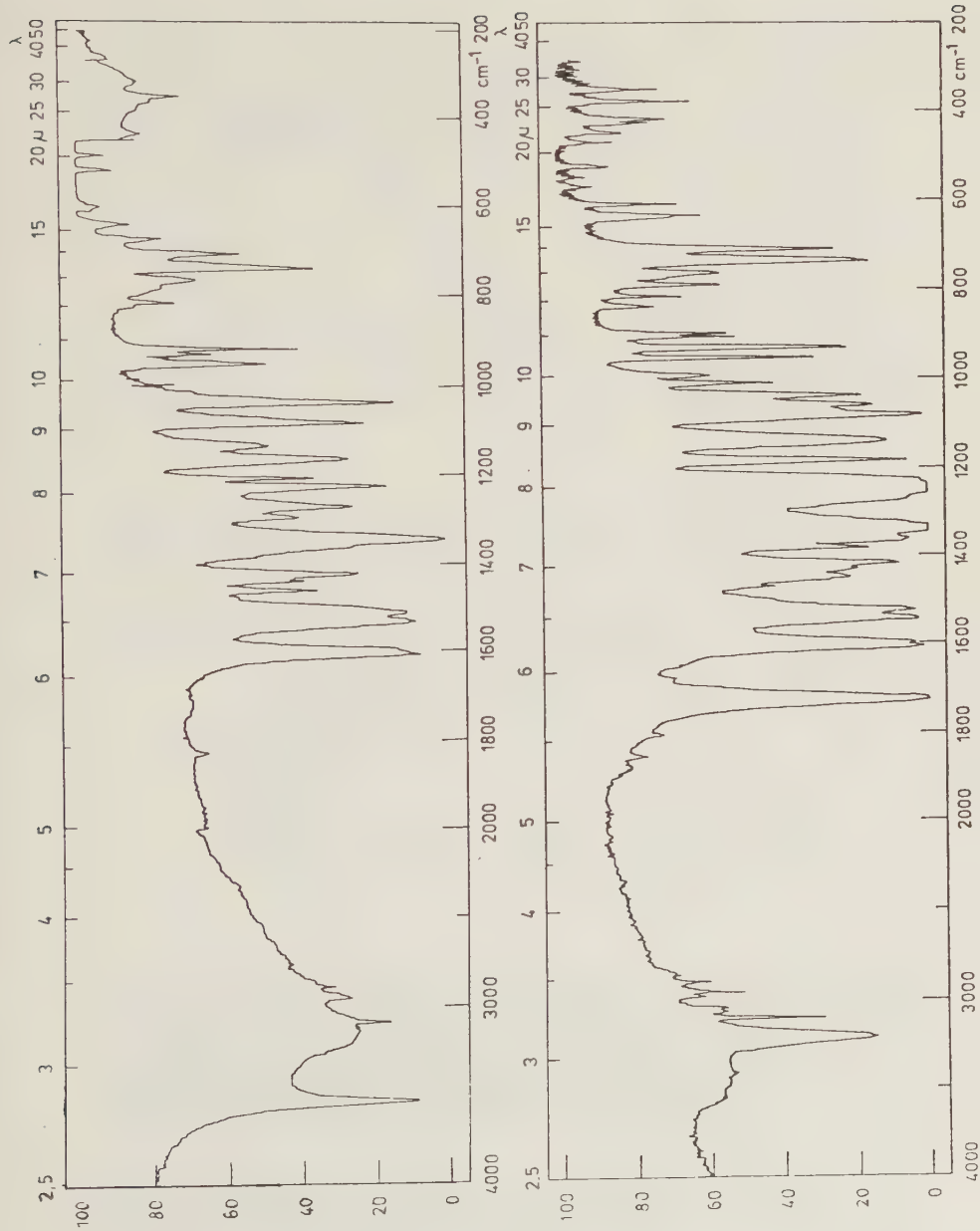


analyse läßt sich die für HE-DNP in Abb. 15 wiedergegebene Struktur bestätigen.

Das in Abb. 12 ebenfalls aufgeführte 90 MHz-Spektrum für AE-DNP zeigt große Ähnlichkeit mit dem HE-DNP-Spektrum. So finden sich die Triplets der Methylengruppen der Seitenkette bei $\delta = 3,15$ und $\delta = 4,33$ mit jeweils zwei Protonen, die Protonen des Ringsystems in 3- und 5-Position bei $\delta = 8,31$ und $\delta = 8,97$ als Dupletts. Die Kopplungskonstanten entsprechen dabei den vorher genannten. Ein bei $\delta = 2,05$ von drei Protonen gebildeter Peak (in Abb. 12 infolge Deutereoacetonverunreinigung größer als normal erscheinend) ist frei von Wechselwirkungen und entspricht einer freien Methylengruppe. Die erwartete Hydroxylgruppe des Phenolsystems ist weiter verschoben bei $\delta = 11,35$ zu sehen. Die Integration zeigt, daß hier nur ein Proton beteiligt ist. Das verwendete Lösungsmittel Deuteriochloroform bildet einen eigenen Peak bei $\delta = 7,23$.

Infrarotspektroskopie: Sie sollte weniger der Strukturaufklärung als vielmehr der Auffindung von gemeinsamen Merkmalen der beiden Proben dienen. Bei der Interpretation der Spektren war Herr PD Dr. Götze, Lehrstuhl für analytische Chemie an der RU-Bochum, NC 4/32 behilflich. In Abb. 13 sind beide Spektren dargestellt. Sie weisen eine Reihe gemeinsamer Schwingungsmuster auf, deren genaue Analyse jedoch hier nicht notwendig erschien. Es lassen sich dagegen weniger aufwendig die in Tabelle 2 genannten folgenden Gruppen lokalisieren.

Abb. 13: Infrarotspektren der Substanzen AE-DNP und HE-DNP.
(S. 65) Oberes Spektrum: HE-DNP 0,27%ig in RbJ-Preßling
(Schichtdicke 0,75 mm).
Unteres Spektrum: AE-DNP 0,6%ig in RbJ-Preßling
(Schichtdicke 0,75 mm).
Weitere Informationen in Tabelle 2



TRANSMISSION (%)

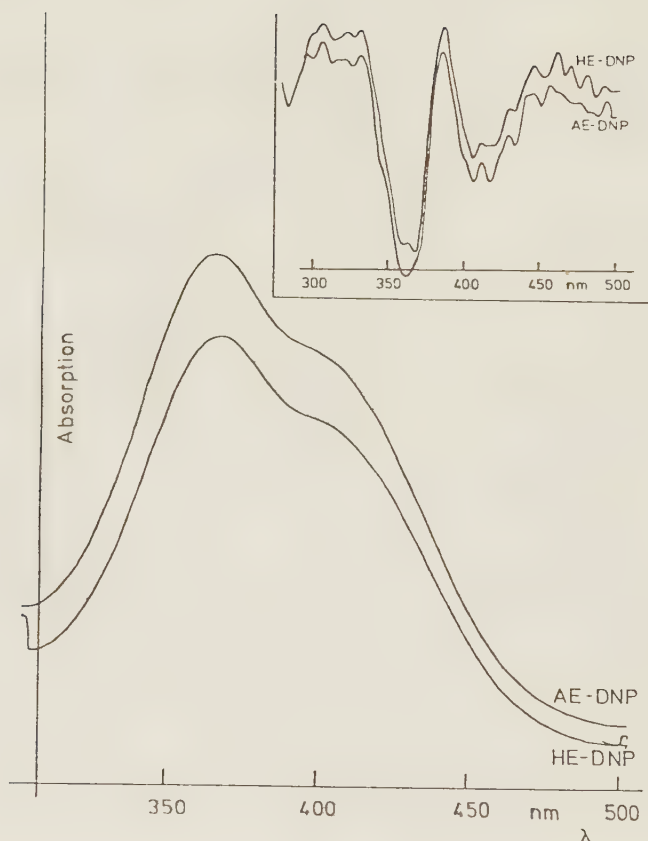
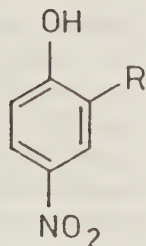
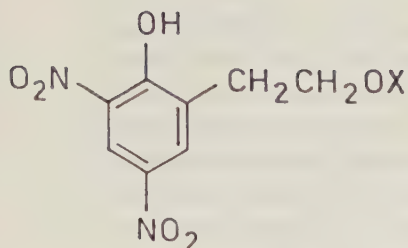


Abb. 14: Absorptionsspektren der Substanzen HE-DNP und AE-DNP im Bereich 300-500 nm. Im Bild rechts oben die zweite Ableitung der Spektren zur Verdeutlichung der Maxima und Minima. Proben der Substanzen (ca. 5 μ M) wurden dazu in 0,1 N NaOH (pH 12,8) gelöst. Durchmesser der Quarzküvette: 1 cm; Spaltbreite: 1 nm



HE - DNP : X = H

DNP : P = NO₂

AE - DNP : X = CH₃CO

NPA : R = N₃

Abb. 15: Molekulare Struktur der vier verwendeten Phenol-derivate

Tabelle 2: Infrarotabsorptionsfrequenzen der für HE-DNP und AE-DNP charakteristischen Gruppen in cm⁻¹. Der angegebene Wert gibt jeweils das Maximum der Absorption an.

	HE-DNP	AE-DNP
CH ₃ COOR:		1250
NO ₂ :	1345 , 1535	1340 , 1546
CO :		1726
OH :	3090 , 3530	3210

Die auffallenden Gemeinsamkeiten sprechen für eine ähnliche Struktur der beiden Moleküle. Frequenzen um 350 - 360 cm⁻¹ entsprechen jeweils Schwingungen eines aromatischen Ringsystems. Der Nachweis einer Acetylgruppe im Fall des AE-DNP trägt wesentlich zur Strukturaufklärung bei.

Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich: Sie ergeben ebenfalls eine weitgehende Ähnlichkeit zwischen HE-DNP und AE-DNP (Abb. 14). Beide Proben zeigen im Bereich 390 nm - 420 nm eine

Schulter (Maximum bei 406,8 nm für AE-DNP bzw. 406,7 nm für HE-DNP). Der Bereich maximaler Absorption findet sich bei 364,5 nm (AE-DNP) bzw. 366,6 nm (HE-DNP). Beide Bereiche liegen nahe beieinander. Weitere Details liefert die 2. Ableitung der Spektren. Auch hier ist die Übereinstimmung weitreichend. Aus den Absorptionsspektren konnte bei bekannter Konzentration und bekannter Schichtdicke der Küvette der millimolare Absorptionskoeffizient ϵ für $\lambda = 367$ nm im Bereich maximaler Absorption zu $16,6 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}$ für AE-DNP und $15,4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}$ für HE-DNP bestimmt werden. Eine andere Bestimmung bei $\lambda = 450$ nm durchgeführt ergab einen extrapolierten Wert von $14,8 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}$ für AE-DNP und $13,8 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}$ für HE-DNP, womit grob, aber nicht präzise bestimmt ist.

Für die Strukturaufklärung des HE-DNP ist sowohl die Elementaranalyse als auch die NMR-Spektroskopie ausschlaggebend gewesen, die beide auf die Molekülstruktur in Abb. 15 schließen lassen. AE-DNP ist strukturell durch weitgehende Übereinstimmung in allen Spektren mit HE-DNP charakterisiert sowie durch den NMR- und infrarotspektroskopischen Nachweis der Acetylgruppe. AE-DNP läßt sich durch Esterhydrolyse in HE-DNP überführen (s. 2.3.3). Durch diesen chemischen Nachweis ist gleichzeitig die Stellung der Acetylgruppe in 2'-Position bestätigt (Abb. 15).

3.3 Hinweise auf allgemeine Eigenschaften der Membrandurchgängigkeit

3.3.1 Dissoziationsverhalten

HE-DNP und AE-DNP sind schwache organische Säuren. Im gelösten Zustand wird das Ausmaß der Absorption im sichtbaren Bereich hauptsächlich durch die Anwesenheit der anionischen Form bestimmt, während die neutrale Form hier kaum Licht absorbiert. Bei dem angewandten spektrophotometrischen Verfahren (s. 2.3.2) lassen sich die entsprechenden pK-Werte der Entkoppler gut bei

$E_{\max}/2$ ermitteln. Abb. 16 und Abb. 17 zeigen die graphische Ermittlung des pK-Wertes für HE-DNP und AE-DNP. $E_{\max}$ wurde etwa bei pH 12 erreicht. Eine etwas genauere Möglichkeit der graphischen Ermittlung bietet das Auftragen des reziproken Wertes der Extinktion gegen die Wasserstoffionenkonzentration $[H^+]$. Die so erhaltene Gerade schneidet die Abszisse im Bereich der negativen Wasserstoffionenkonzentration, deren negativer dekadischer Logarithmus den Wert für pK ergibt. Die pK-Werte betragen für HE-DNP 4,19, für AE-DNP 4,02, die Ionisationskonstanten entsprechend $6,4 \cdot 10^{-5}$ M bzw. $9,5 \cdot 10^{-5}$ M. Trotz der unterschiedlichen Seitenketten besitzen die beiden Entkoppler annähernd das gleiche Dissoziationsverhalten, was auch für das nahe verwandte 2,4-Dinitrophenol $[pK = 4,1 \text{ (67)}]$ charakteristisch ist. In biologischen Membranen kann aufgrund der Elektroneutralität nur die nichtdissoziierte Form frei passieren und bestimmt damit die Entkopplerwirksamkeit zum großen Teil. Da HE-DNP und AE-DNP bezüglich des pK-Wertes kaum einen Unterschied aufweisen, ist unter diesem Aspekt eine Änderung der Membrandurchgängigkeit nicht zu erwarten.

3.3.2 Lipidlöslichkeit

Hemker (62) weist darauf hin, daß das Ausmaß der Entkopplung von Phenolderivaten nicht so sehr von der Konzentration in der umgebenden wässrigen Phase als vielmehr von der Konzentration in der Lipidphase innerhalb der Mitochondrien abhängig ist. Hansch et al. (67) benutzen den Octanol/Wasser-Verteilungsquotienten P als Maß für die Lipidlöslichkeit von Entkopplern, um Aussagen über ihre Wirksamkeit zu erhalten. P beträgt für HE-DNP 16,91 (Einzelwerte: 17,07; 16,84; 16,81), für AE-DNP 47,01 (Einzelwerte: 47,00; 46,91; 47,11). Hierzu wurde die Extinktion der wässrigen Phase direkt bestimmt, die Extinktion der Octanolphase dagegen indirekt aus der Differenz Extinktion der Stammlösung minus Extinktion der wässrigen Phase ermittelt. Eine direkte Bestimmung des Gehaltes in der Octanolphase lieferte etwa 10% geringere Werte für P, im Mittel 15,4 für HE-DNP und 42,0 für AE-DNP, da nicht aller Entkoppler hierzu aus der Octanolphase zurückgewonnen wurde (s. 2.3.4).

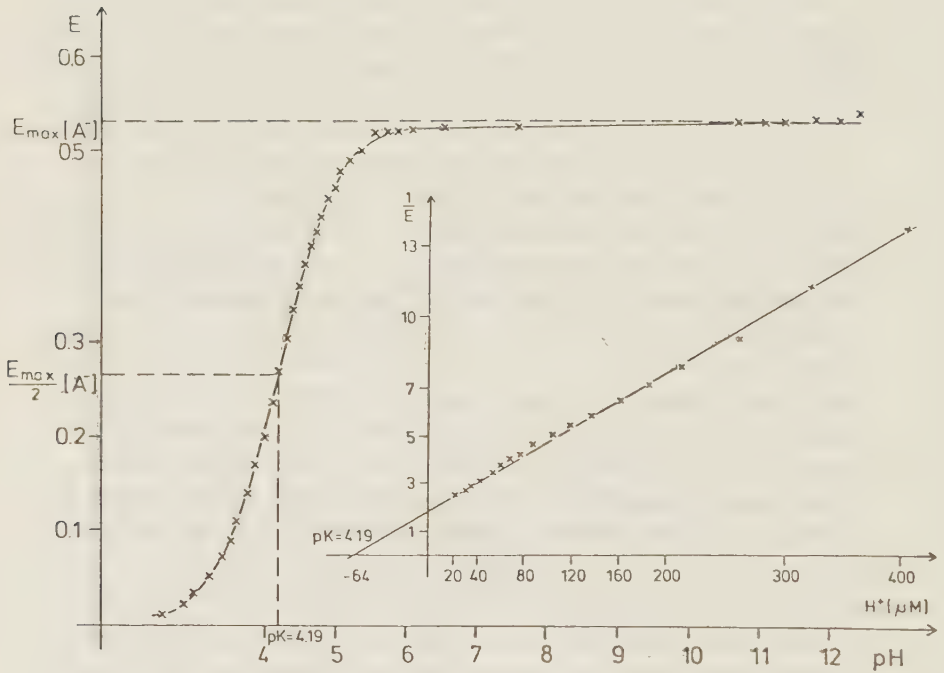


Abb. 16: Photometrische pK-Wert Bestimmung des Entkopplers HE-DNP. Eingeschobenes Diagramm: Der reziproke Wert der Extinktion aufgetragen gegen die Wasserstoffionenkonzentration erlaubt eine präzisere Bestimmung des pK-Wertes

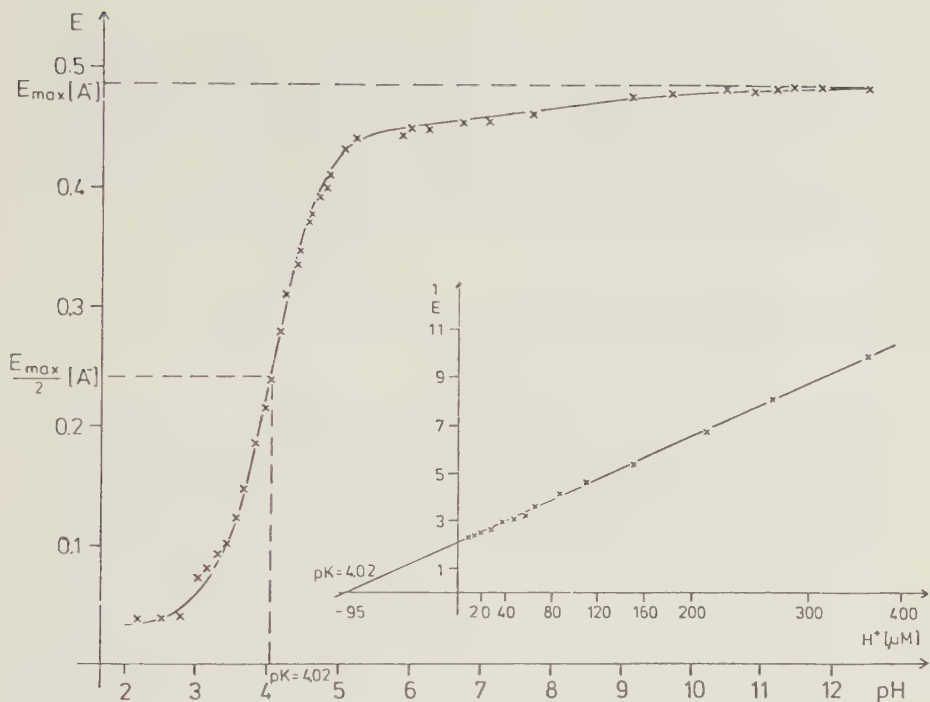


Abb. 17: Photometrische pK -Wert Bestimmung des Entkopplers AE-DNP. Eingeschobenes Diagramm: Der reziproke Wert der Extinktion aufgetragen gegen die Wasserstoffionenkonzentration erlaubt eine präzisere Bestimmung des pK -Wertes

Erst in einem Wiederholungsvorgang konnte der größte Teil der Restdifferenz zurückgewonnen werden.

Hinsichtlich möglicher Wechselwirkungen mit Lipidschichten in der Membran wurden keine näheren Untersuchungen durchgeführt. Das Dipolmoment der Seitenketten beider Entkoppler liegt nahe beieinander und beträgt für HE-DNP 1,69, für AE-DNP 1,78 (119). Es ist daher anzunehmen, daß hierin keine Unterschiede bezüglich der Entkopplerwirkung begründet sind.

3.4 Kompetitive Verdrängung des Entkopplers NPA aus seiner Bindungsstelle

Hanstein konnte in Gleichgewichtsbindungsstudien zeigen, daß eine Reihe bekannter Entkoppler, so z.B. Dinitrophenol, Pentachlorophenol, S-13, CCCP und Picrat, NPA aus einer Bindungsstelle an der ATPase kompetitiv verdrängen (58). Es wurden daher analoge Bindungsstudien an Rattenlebermitochondrien mit den neuen Entkopplern HE-DNP und AE-DNP durchgeführt (s. 2.3.5).

In Abb. 18 ist der Anteil an radioaktiv markiertem [^3H]NPA, der an Protein gebunden ist, gegen die Konzentrationen von AE-DNP und HE-DNP aufgetragen. Die angegebenen drei Konzentrationen von NPA beziehen sich auf den Anteil des freien im Überstand vorhandenen [^3H]NPA. Es ist ersichtlich, daß HE-DNP, insbesondere AE-DNP, einen Teil des gebundenen [^3H]NPA kompetitiv verdrängen. Die Bindung des NPA an Mitochondrien unter Gleichgewichtsbedingungen erfolgt in zwei verschiedenen Phasen (96, 100): eine Bindungsstelle mit hoher Affinität, die bei 3°C und pH 7,0 etwa $0,56 \pm 0,13$ nmol NPA/mg Protein aufnehmen kann (100), wird von anderen Entkopplern schon bei geringeren Konzentrationen kompetitiv stark besetzt. Unspezifische Bindungsstellen mit geringerer Affinität, die NPA linear abhängig von der Konzentration binden und auch durch größere Mengen NPA [bis 600 μM NPA (96)] nicht abgesättigt sind, werden hingegen nur wenig beeinflusst. Bei den eingesetzten Konzentrationen von 8,8 μM , 15,6 μM und 23,7 μM freiem NPA ist der

INHIBITION OF NPA BINDING IN RAT LIVER
MITOCHONDRIA BY HE-DNP AND AE-DNP

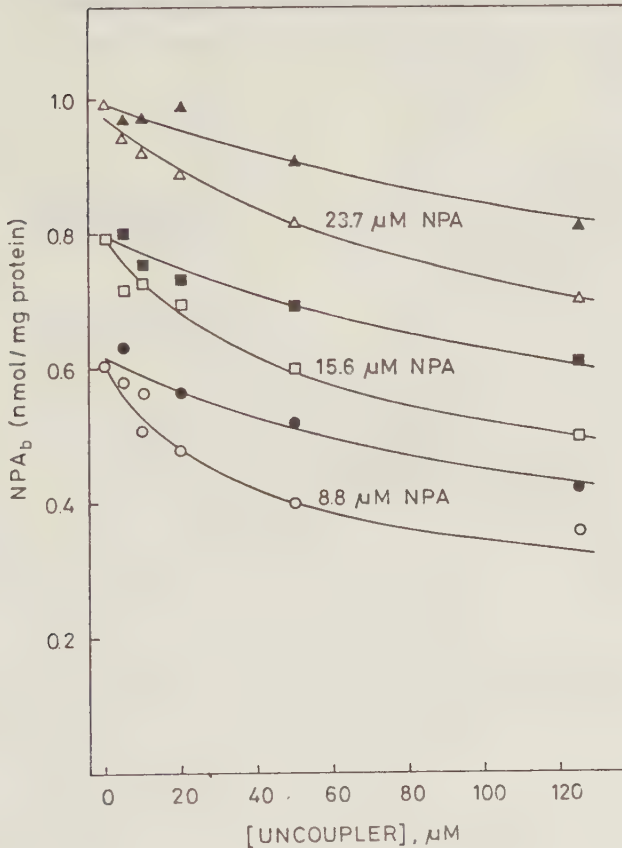


Abb. 18: Inhibierung der Bindung von NPA an Rattenlebermitochondrien durch HE-DNP (ausgefüllte Symbole) und AE-DNP (offene Symbole). Die kompetitiven Bindungsexperimente wurden mit Hilfe von $[^3\text{H}]\text{NPA}$ an frisch präparierten Rattenlebermitochondrien (2 mg/ml) in Saccharose-Tris-Cl Puffer (s. 2.3.5) ausgeführt. Versuchstemperatur: 2-4°C

COMPETITIVE INHIBITION BY HE-DNP OF NPA-BINDING IN MITOCHONDRIA. DIXON PLOT.

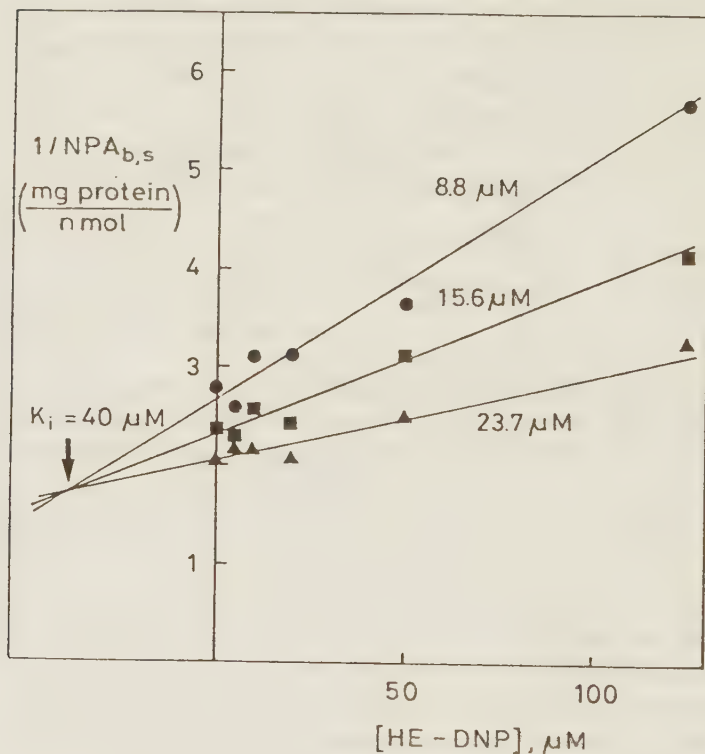


Abb. 19: Kompetitive Inhibierung der Bindung von NPA an Rattenlebermitochondrien durch HE-DNP in Gegenwart von $8,8 \mu M$ ($\bullet$), $15,6 \mu M$ ($\blacksquare$) und $23,7 \mu M$ ($\blacktriangle$) NPA. Reziproke Darstellung des Anteils kompetitiver Verdrängung des NPA aus spezifischen Bindungen an mitochondrialem Protein (Dixon plot). Graphische Ermittlung der Inhibitorkonstante für HE-DNP. Versuchsbedingungen s. 2.3.5

COMPETITIVE INHIBITION BY AE-DNP OF NPA-BINDING IN MITOCHONDRIA. DIXON PLOT.

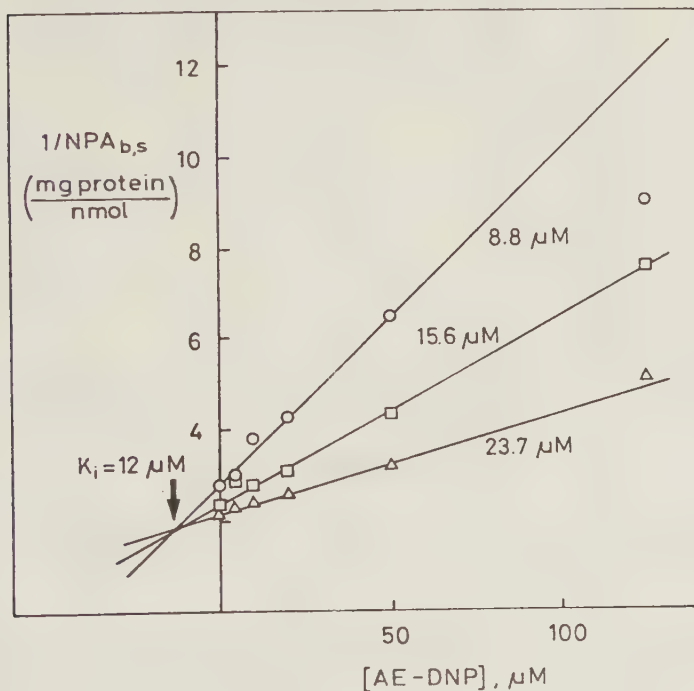


Abb. 20: Kompetitive Inhibition der Bindung von NPA an Rattenlebermitochondrien durch AE-DNP in Gegenwart von $8,8 \mu M$ (o), $15,6 \mu M$ (□) und $23,7 \mu M$ (Δ) NPA. Reziproke Darstellung des Anteils kompetitiver Verdrängung des NPA aus spezifischen Bindungen an mitochondrialem Protein (Dixon plot). Graphische Ermittlung der Inhibitorkonstante für AE-DNP. Versuchsbedingungen s. 2.3.5

UNSPECIFIC BINDING OF NPA BY RAT LIVER MITOCHONDRIA

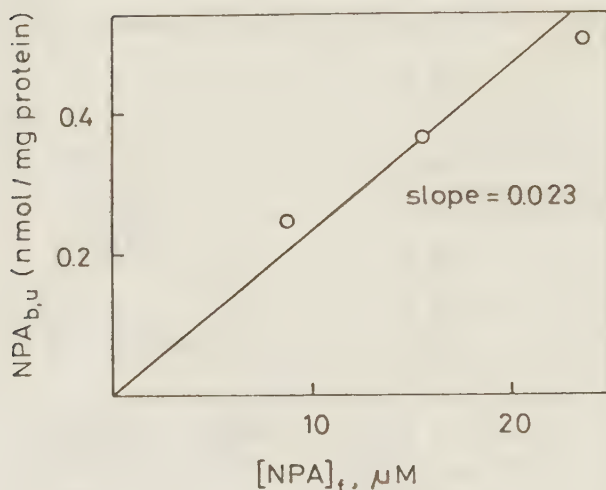


Abb. 21: Unspezifische Bindung von NPA an Rattenlebermitochondrien

Anteil an unspezifischer Bindung in etwa gleich der spezifischen. Abb. 21 zeigt die lineare Abhängigkeit der unspezifischen Bindung des NPA von der Konzentration. Pro μM freiem NPA werden 0,023 nmol/mg Protein gebunden.

Die beiden Dixon plots in Abb. 19 und Abb. 20 belegen, daß die Verdrängung des NPA aus der Entkopplerbindungsstelle ein kompetitiver Vorgang ist. Die Inhibitorkonstante K_i ist für alle drei eingesetzten NPA-Konzentrationen gleich (zur Vorgehensweise der Auswertung s. 2.3.5). Der Anteil unspezifischer Bindung wurde dazu vorher subtrahiert. Die Inhibitorkonstanten betragen für AE-DNP 12 μM , für HE-DNP 40 μM . AE-DNP ist gut 3 mal stärker an der Bindung beteiligt.

In Abb. 22 und Abb. 23 sind die Steigungen aus den Abbildungen 19 und 20 gegen den reziproken Wert von NPA_f aufgetragen, anhand derer sich die Dissoziationskonstante für NPA berech-

COMPETITIVE INHIBITION OF NPA
BINDING BY HE-DNP.
PLOT OF THE DIXON SLOPES.

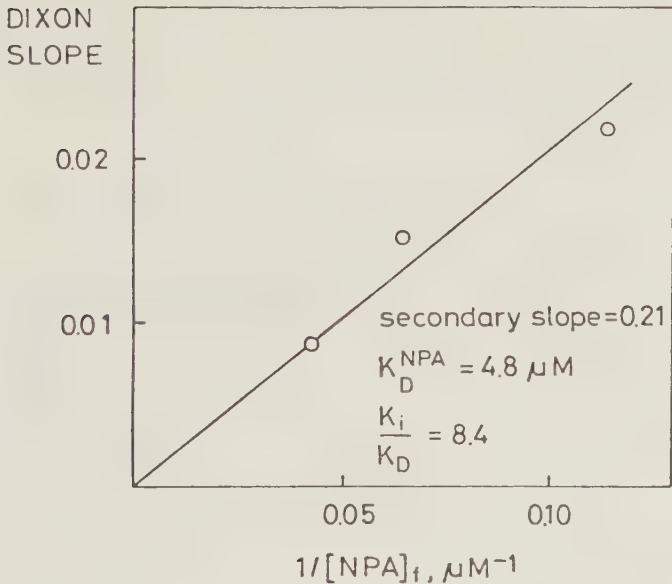


Abb. 22: Kompetitive Inhibierung der Bindung von NPA an Rattenlebermitochondrien durch HE-DNP:
Darstellung der Steigungen des Dixon plots (s. Abb. 19) in Abhängigkeit vom reziproken Wert der eingesetzten Konzentration an freiem NPA (NPA_f). Angabe der hieraus ermittelten Größen

COMPETITIVE INHIBITION OF NPA
BINDING BY AE-DNP.
PLOT OF THE DIXON SLOPES.

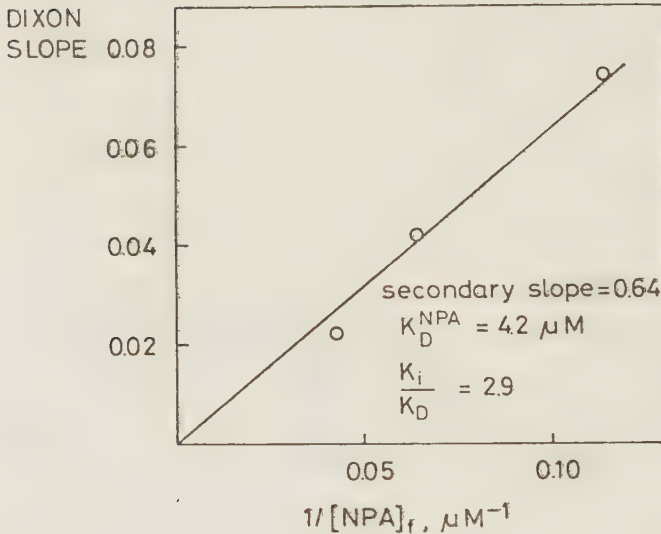


Abb. 23: Kompetitive Inhibierung der Bindung von NPA an Rat-
tenlebermitochondrien durch AE-DNP:
Darstellung der Steigungen des Dixon plots (s. Abb.
20) in Abhängigkeit vom reziproken Wert der einge-
setzten Konzentration an freiem NPA (NPA_f). Angabe
der hieraus ermittelten Größen

nen läßt (Herleitung s. 2.3.5). Sie betrug im Experiment $4,2 \mu\text{M}$ bzw. $4,8 \mu\text{M}$ und entspricht dem in (100) angegebenen Wert $6 \pm 3 \mu\text{M}$. Verglichen mit NPA bindet AE-DNP somit 3 mal schwächer, HE-DNP 8 mal schwächer an die Entkopplerbindungsstelle.

3.5 Beeinflussung energieabhängiger Funktionen in Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln, insbesondere der energiegetriebenen Transhydrogenase

3.5.1 Direkte Einwirkung der Entkoppler auf die Atmungskontrolle in Rattenlebermitochondrien

Für polarographische Messungen wurden Rattenlebermitochondrien jeweils am Tage der Messung frisch isoliert und sofort verwertet. Um einen direkten Einfluß der Entkoppler auf Enzyme der Atmungskette erkennen zu können, wurden sie sowohl in Gegenwart von β -Hydroxybutyrat als auch von Succinat als Substrat eingesetzt und so Seite I-Atmung mit Seite II-Atmung verglichen.

Ein Beispiel für die durch Entkoppler stimulierte mitochondriale Atmung zeigt Abb. 24. Gleichzeitig wird die Bestimmung des RCR-Wertes und des P/O-Quotienten verdeutlicht.

Der RCR-Wert (respiratory control ratio) ist eine Angabe darüber, inwieweit die Atmungskette mit der Phosphorylierung gekoppelt ist. Steigt [ADP] durch Zugabe plötzlich an, so ändert sich dementsprechend das Phosphorylierungspotential, was in der Regel mit einer sofortigen Erhöhung der Substratoxidationsrate in der Atmungskette verbunden ist, um ATP zu erzeugen. Der RCR-Wert ist in Abb. 24 gegeben durch das Verhältnis der Steigungen der Geraden A_1 zu B_1 bzw. der Steigungen der Geraden A_2 zu B_2 nach Zusatz von AE-DNP. In diesem Fall zeigt das kleinere Verhältnis bereits das Ausmaß der Entkopplung an. A wird gebräuchlich als "state 3" = aktiver Zustand, B als "state 4" = Ruhezustand der mitochondrialen Atmung bezeichnet. Im Versuch betrugen die RCR-Werte vor Gabe von Entkoppler zwischen 3 und 5,5.

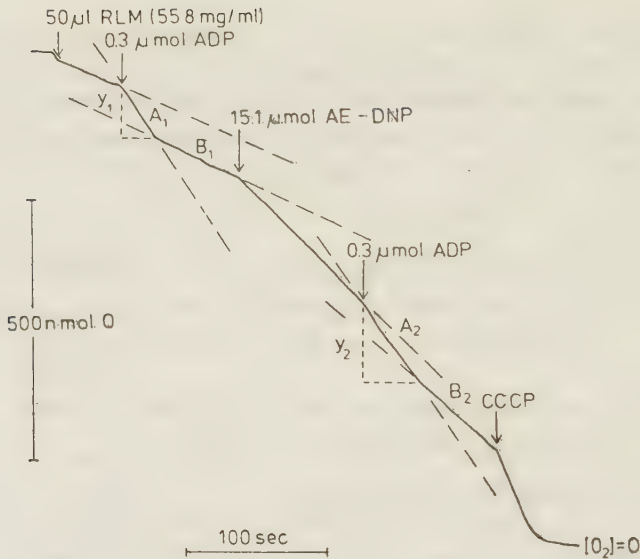


Abb. 24: β -Hydroxybutyrat-getriebene Atmungskontrolle in Rat-lebermitochondrien (polarographische Aufzeichnung). Bestimmung von RCR-Wert und P/O-Quotient vor und nach Zugabe von Entkoppler (näheres s. Text). Bedingungen wie in Abb. 25 und 26.

P/O-Quotient: Er setzt sich aus dem Verhältnis eingesetzte Menge ADP zur dabei verbrauchten Menge an Sauerstoff zusammen. P/O-Quotient und RCR-Wert verhalten sich gleichsinnig, d.h. mit zunehmender Entkopplung nehmen beide Werte ab. In Abb. 24 bezeichnet y_1 die verbrauchte Sauerstoffmenge in der Zeit, in der sich der Schreiber nach ADP-Stimulierung um die Strecke A_1 weiter bewegt hat. Die wesentlich größere Strecke y_2 für die gleiche Menge ADP zeigt an, daß die Mitochondrien nur noch schwach gekoppelt sind. Die Eichung der Schreiberskala erfolgte mit luftgesättigtem, 30°C warmen Wasser, dessen Sauerstoffgehalt mit 465 ng atom O/ml (110) angegeben wird. P/O-Quotienten betrugen im Versuch für die β -Hydroxybutyrat-getriebene Atmungskontrolle im Mittel 2,81, für die Succinat-getriebene Atmung im Mittel 1,90, jeweils vor Zusatz von Entkopplern.

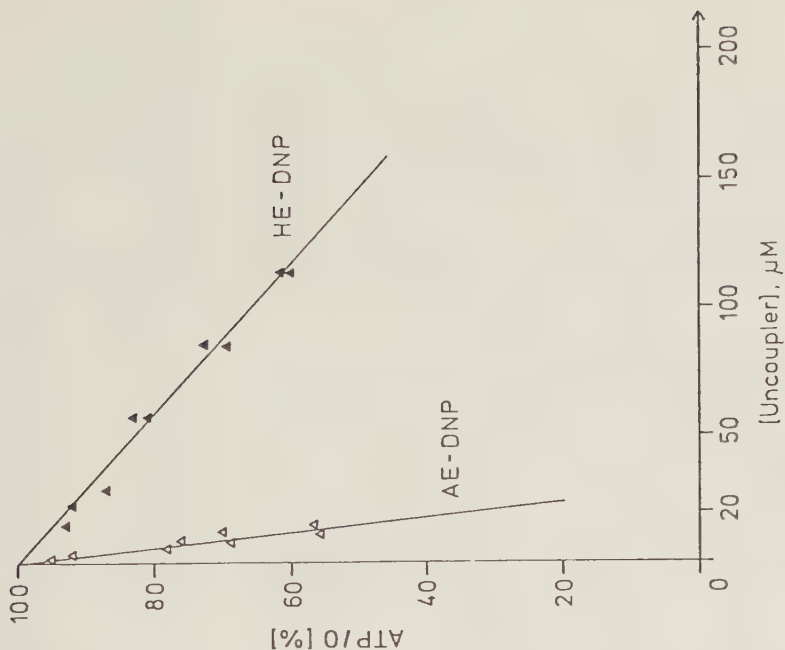
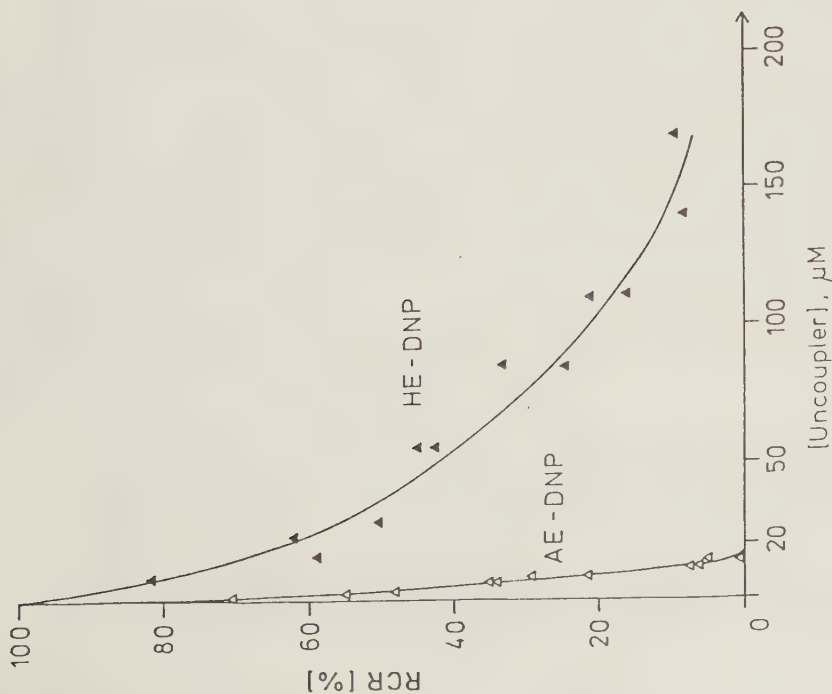


Abb. 25 und 26: Einfluß von HE-DNP (▲) und AE-DNP (△) auf die β -Hydroxybutyrat-getriebene Atmungskontrolle in Rattenlebermitochondrien: Abnahme des RCR-Wertes (linkes); Abnahme des ATP/O-Quotienten (rechtes Bild). RLM (1-2 mg/ml) werden in ein unter 2.5.1 beschriebenes Medium gegeben. Zusatz: ADP (170 μM). Versuchstemperatur: 30°C

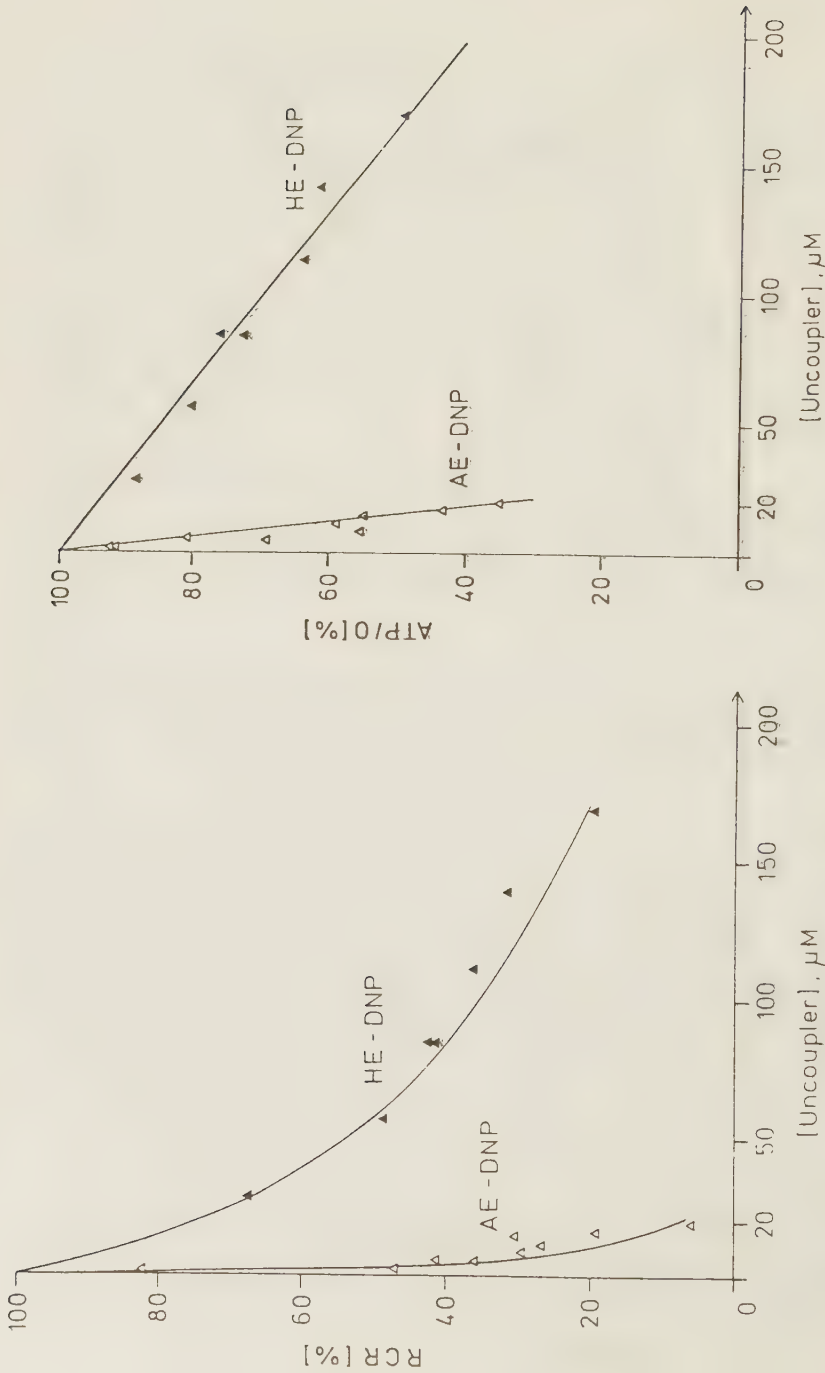


Abb. 27 und 28: Einfluß von HE-DNP ($\blacktriangle$) und AE-DNP ($\triangle$) auf die Succinat-getriebene Atmungskontrolle in Rattenlebermitochondrien: Abnahme des RCR-Wertes (linkes); Abnahme des ATP/O-Quotienten (rechtes Bild); RLM (1-2 mg/ml) werden in ein unter 2.5.1 beschriebenes Medium gegeben. Zusatz: ADP (170 μM). Versuchstemperatur: 30°C

Abb. 25 bis 28 zeigen die prozentuale Abnahme der RCR-Werte und der P/O-Quotienten abhängig von der Konzentration von HE-DNP und AE-DNP. Erwartungsgemäß wird die β -Hydroxybutyrat-getriebene Atmung weniger stimuliert aufgrund des höheren Betrages der protonentreibenden Kraft (vgl. Ref. 120). HE-DNP und AE-DNP wirken unterschiedlich stark auf die Atmungskontrolle, was in Tabelle 3 zusammengefaßt ist.

Tabelle 3: Wirkung von HE-DNP und AE-DNP auf die Atmungskontrolle und den P/O-Quotienten in RLM. Vergleich der Konzentrationen für 50% Entkopplung ($\phi_{1/2}$). Angabe in μM

		HE-DNP	AE-DNP	Quotient $\frac{H}{A}$
Atmungs- kontrolle	β -HDB :	173	12	14,4
	Succinat:	130	9	14,4
P/O	β -HDB :	145	14	10,4
Quotient	Succinat:	170	15	11,3

AE-DNP zeigt eine 10- bis 14-fach überlegene Wirkung, was unter Berücksichtigung der übrigen Ergebnisse (s. 3.8) unerwartet hoch erscheint. Wie pK-Wert- und Verteilungskoeffizientbestimmung ergeben haben, kann die zusätzliche Hydroxylgruppe des HE-DNP Moleküls allein nicht für den beobachteten Effekt verantwortlich gemacht werden. Es ist jedoch denkbar, daß Hindernisse bei der Membranpassage die Wirkung des Entkopplers HE-DNP auf die Atmungskontrolle abschwächen.

3.5.2 Einfluß auf enzymatische Reaktionen in submitochondrialen Partikeln

3.5.2.1 Reverser Elektronentransport

In submitochondrialen Partikeln ist normalerweise die Atmungskette noch mit der Phosphorylierungsstelle gekoppelt. Es ist daher möglich, unter Aufwendung von Energie, etwa durch ATP-Hydrolyse, auch einen rückwärtigen Elektronentransport in der Atmungskette zu ermöglichen. Dabei übernimmt infolge der Änderung des Phosphorylierungspotentials nach ATP-Gabe die

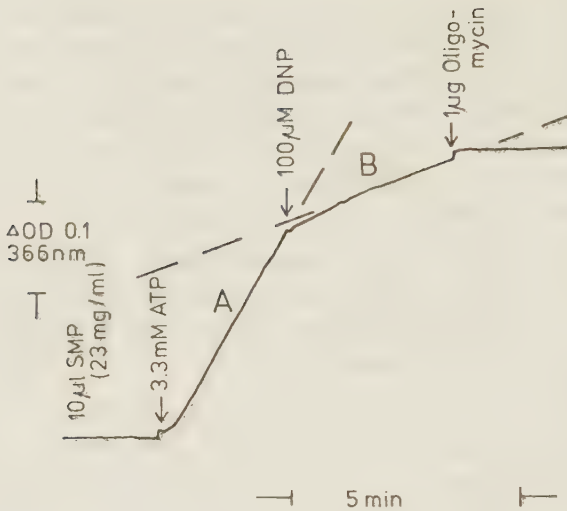


Abb. 29: Reverser Elektronentransport in submitochondrialen Partikeln: Reaktionsablauf. SMP (0,2 mg/ml) werden in ein unter 2.5.2 beschriebenes Medium gegeben. Zusatz: ATP (3,4 mM). Versuchstemperatur: 30°C

ATPase eine Funktion als Protonenpumpe, mit der ein Energiepool gespeist wird, welcher wiederum den rückwärtigen Elektrotenfluß von Seite II nach Seite I anregt. In diesen Energiepool greifen zugesetzte Entkoppler ein.

In Abb. 29 ist ein solches Experiment aufgezeichnet. Das Verhältnis der Steigungen der Geraden A zu B zeigt den Entkopplungsgrad an. Nach Gabe von Oligomycin ist die membrangebundene ATPase gehemmt, als Folge wird der rückwärtsgerichtete Elektronentransport gestoppt.

Für Versuche wurden Schallpartikel von zwei Präparationstagen verwendet. Die spezifische Aktivität der an der Atmungskette beteiligten NAD-Dehydrogenase, die für die NADH-Bildung verantwortlich ist, wurde wie folgt bestimmt, wobei für NADH ein mikromolarer Extinktionskoeffizient ϵ von 3,3 für $\lambda = 366$ nm

angenommen wurde:

$$s.A. = \frac{\text{durchschnittl. Änderung der Extinktion}}{\text{min} \cdot \epsilon \cdot \text{zugesetzte Menge Protein}}$$

Neben der durchschnittlichen Aktivität der NAD-Dehydrogenase wurden vergleichsweise die Standardabweichung s_n und die Abweichung vom wahren Mittelwert s_{n-1} bestimmt, die in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4: Durchschnittliche spezifische Aktivitäten der NAD-Dehydrogenase aus zwei Meßreihen mit SMP von zwei Präparationstagen

	n	spez. Akt. ^a	s_n %	s_{n-1} %
1. Meßtag:	19	0,130	11,72	12,02
2. Meßtag:	29	0,141	6,30	6,41

a) Angabe in $\mu\text{mol NADH/min} \cdot \text{mg Protein}$

Die entkoppelnde Wirkung der Substanzen HE-DNP, AE-DNP, DNP und NPA ist in Abb. 30 und Abb. 31 dargestellt. $\phi_{1/2}$, d.h. die Konzentration, bei der 50% Entkopplung eintritt, beträgt für HE-DNP 40 μM , dagegen für AE-DNP nur 7 μM , womit der acetylierte Entkoppler etwa 6-fach überlegen ist. Ähnlich dem HE-DNP wirkt das keine Seitenkette besitzende DNP ($\phi_{1/2} = 38 \mu\text{M}$), wenn auch insgesamt etwas wirkungsvoller. Die Azidoverbindung NPA wiederum besitzt einen größeren Einfluß auf die Unterbindung des reversen Elektronentransports ($\phi_{1/2} = 15 \mu\text{M}$).

3.5.2.2 Transhydrogenasereaktion

Die Aktivität der Transhydrogenase als Protonenpumpe (37) ist insbesondere von dem Grad der Energisierung abhängig. Ohne Succinat- oder ATP-Zusatz ist die spezifische Aktivität relativ niedrig. Sie beträgt nur gut 10% der energiegetragenen Rate. Die ATP-getragene Reaktion kann mit Oligomycin inhibiert werden (111), was zeigt, daß das die Transhydrogenasereaktion treibende energiereiche Intermediat durch ATP-Hydrolyse an der membranständigen ATPase entsteht. Die Succinat-

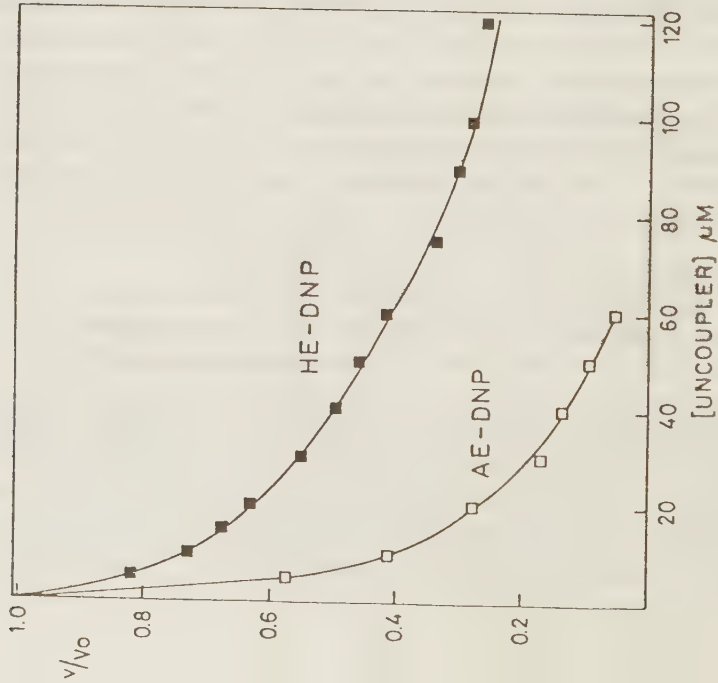
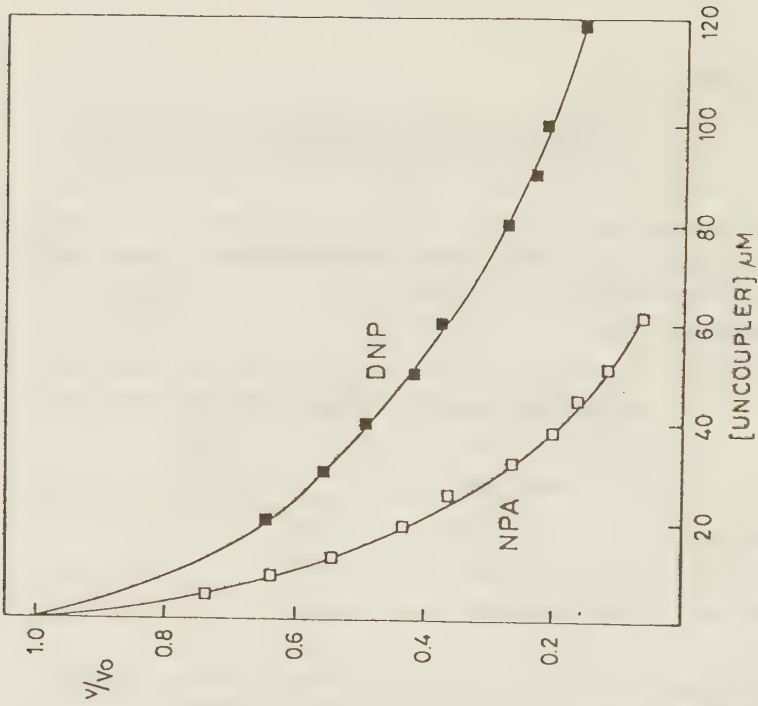


Abb. 30 und 31: Reverser Elektronentransport in submitochondrialen Partikeln: Inhibierung durch HE-DNP ($\blacksquare$) und AE-DNP ($\square$) (linkes); Inhibierung durch DNP ($\blacksquare$) und NPA ($\square$) (rechtes Bild). Bedingungen wie in Abb. 29

getriebene Reaktion hingegen wird nicht beeinflusst, da hier die Speisung des Energiepools direkt durch die Atmungskette erfolgt. Um die Oxidation des NADH in der Atmungskette zu vermeiden, wurde Rotenon zugesetzt, das den Elektronenfluß in Komplex I hemmt. Wegen der möglichen Nebenwirkungen von Zyanid (121, 122) wurde auch in der ATP-getriebenen Reaktion Rotenon verwendet.

Eine Transhydrogenasemessung ist beispielhaft in Abb. 32 dargestellt. Sie zeigt die Aktivität der nicht-energisierten Transhydrogenase = Nullaktivität (Gerade A) im Vergleich zur Aktivität nach ATP-Gabe (Gerade B) sowie nach Inhibierung durch Entkoppler (Gerade C). Nach Zusatz von Oligomycin bleibt nur noch die Nullaktivität erhalten. Berücksichtigt wird lediglich der Anteil der energiegetriebenen Transhydrogenase. Die prozentuale Inhibierung wird bestimmt durch den Quotienten der Steigungsdifferenzen $\overline{C-A}/\overline{B-A}$.

Tabelle 5 zeigt die durchschnittliche spezifische Aktivität der Transhydrogenase an fünf Meßtagen, wobei Schallpartikel von zwei Präparationstagen verwendet wurden. Mit aufgeführt sind die prozentuale Standardabweichung s_n sowie die Abweichung vom wahren Mittelwert s_{n-1} . Es fällt auf, daß die Succinat-getriebene Transhydrogenase etwa 10% mehr Aktivität entfaltet als die ATP-getriebene [vgl. Ernster (121)].

Die Entkopplerwirkungen von HE-DNP und AE-DNP sind in Abb. 33 dargestellt. AE-DNP inhibiert die ATP-getriebene Transhydrogenase in einem deutlich geringeren Grade als die Succinat-getriebene Reaktion. So wird eine 60%ige Inhibierung mit 60 μ M AE-DNP in Gegenwart von Succinat erreicht, während mit ATP als Energiequelle 100 μ M AE-DNP nötig sind. Im Gegensatz dazu spricht die ATP- und Succinat-getriebene Transhydrogenase-reaktion weniger auf HE-DNP als Entkoppler an, und die ATP-getriebene Reaktion ist leichter entkoppelbar. Diese Wirkungen sind nicht auf AE-DNP und HE-DNP beschränkt. Ebenfalls im gleichen System benutzt wurden NPA und DNP (s. Abb. 34). NPA inhibiert ähnlich dem AE-DNP die Succinat-abhängige Reaktion. Auch N-nonyl-N'-phenylthioharnstoff, ein chemisch nicht

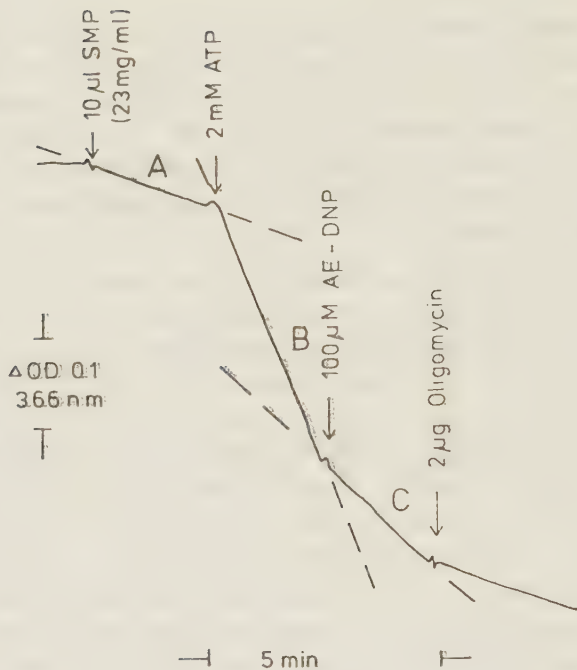


Abb. 32: Energiegetriebene Transhydrogenasereaktion in sub-mitochondrialen Partikeln: Reaktionsverlauf. SMP (0,2 - 0,4 mg/ml) werden in ein unter 2.5.3 beschriebenes Medium gegeben. Zusatz: ATP (2 mM). Versuchstemperatur: 30°C

verwandter, entkopplerähnlicher Inhibitor des Energietransfers, ist in dieser Beziehung dem AE-DNP und NPA vergleichbar (Kiehl, persönliche Mitteilung). Ernster und Danielson haben bereits für DNP einen solchen Effekt beschrieben (123, 124). In unseren Experimenten konnten mit DNP als Entkoppler jedoch keine Unterschiede festgestellt werden. In Tabelle 6 sind die Konzentrationen, bei denen 50% Inhibierung eintritt ($\hat{= } \phi_{1/2}$) aufgeführt.

Tabelle 5

Durchschnittliche spezifische Aktivität der NAD-Transhydrogenase
an 5 Meßtagen mit SMP von 2 Präparationstagen

	n	Nicht energ. Transhydrogenase		Energ. Transhydrogenase			
		s.A. ^a	S _n [%]	S _{n-1} [%]	s.A. ^a	S _n [%]	S _{n-1} [%]
a) Succinat-getr.							
1. Meßtag	15	0.022	20.71	21.44	0.216	13.48	13.95
2. Meßtag	6	0.031	5.47	7.66	0.231	5.94	6.51
3. Meßtag	14	0.025	15.31	15.90	0.181	9.74	10.11
4. Meßtag	10	0.025	12.94	13.64	0.181	10.73	11.31
5. Meßtag	21	0.026	13.10	13.43	0.190	13.82	14.16
6. Meßtag	22	0.029	14.18	14.52	0.217	9.01	9.22
<u>Gesamt</u>	88	0.026	10.08	10.13	0.202	8.61	8.66
b) ATP-getr.							
1. Meßtag	15	0.026	11.92	12.33	0.201	10.03	10.39
2. Meßtag	4	0.022	8.20	9.47	0.168	3.30	3.91
3. Meßtag	8	0.025	12.24	13.08	0.166	12.75	13.63
4. Meßtag	6	0.028	27.59	30.22	0.181	14.35	15.72
5. Meßtag	13	0.025	11.54	12.01	0.190	8.05	8.38
6. Meßtag	8	0.028	7.69	8.22	0.209	4.99	5.33
<u>Gesamt</u>	54	0.026	6.22	6.28	0.190	7.77	7.84

a) Angabe in $\mu\text{mol NADH}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$

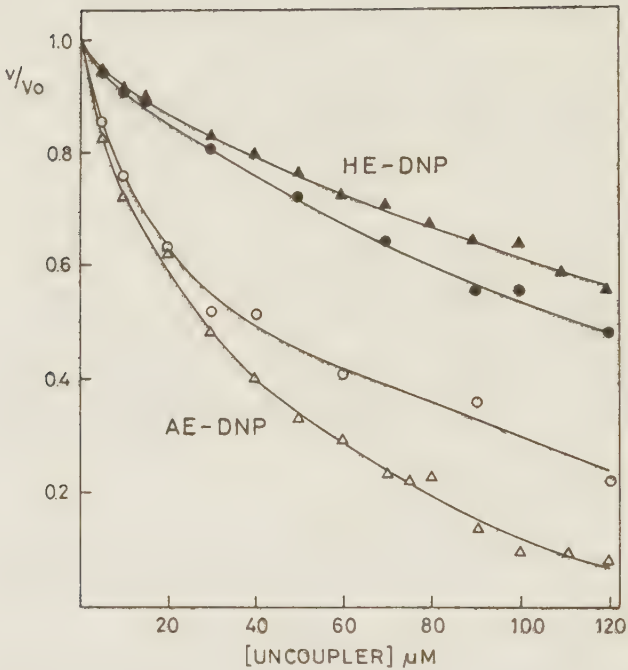


Abb. 33: Energiegetriebene Transhydrogenasereaktion in sub-mitochondrialen Partikeln: Inhibition der Succinat- (Δ , $\blacktriangle$) und ATP-getriebenen Reaktion ($\circ$, $\bullet$) durch HE-DNP und AE-DNP. SMP (0,2 - 0,4 mg/ml) werden in ein unter 2.5.3 beschriebenes Medium gegeben. Zusätze: ATP (2 - 2,5 mM), Succinat (4 - 5 mM). Versuchstemperatur: 30°C

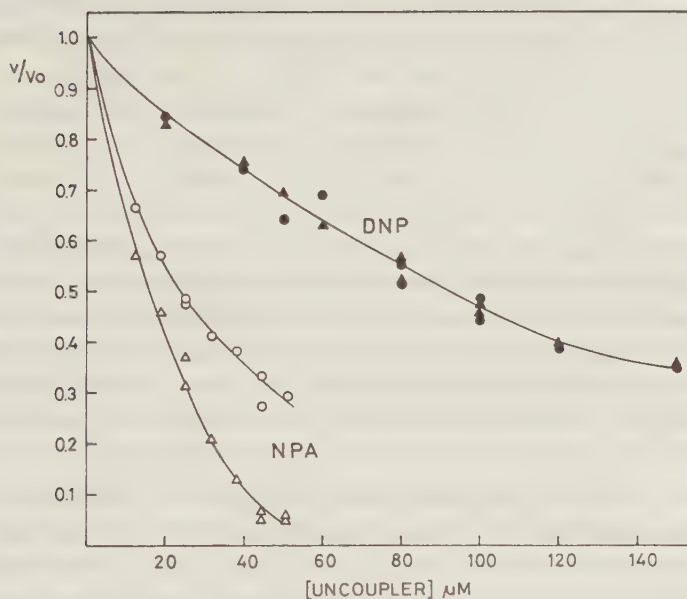


Abb. 34: Energiegetriebene Transhydrogenasereaktion in sub-mitochondrialen Partikeln: Inhibierung der Succinat- (Δ , $\blacktriangle$) und ATP-getriebenen Reaktion ($\circ$, $\bullet$) durch DNP und NPA. SMP (0,2 - 0,4 mg/ml) werden in ein unter 2.5.3 beschriebenes Medium gegeben. Zusätze: ATP (2 - 2,5 mM), Succinat (4 - 5 mM). Versuchstemperatur: 30°C .

Tabelle 6: Einfluß der verwendeten Entkoppler auf die energiegetriebene Transhydrogenase in SMP. Vergleich der Konzentrationen für 50% Entkopplung ($\phi_{1/2}$) für die Succinat- bzw. die ATP-getriebene Reaktion. Angabe in μM .

	HE-DNP	AE-DNP	NPA	DNP
Succinat:	146	28	17	93
ATP :	112	38	25	93

Unabhängig von der unterschiedlichen Wirkung auf die Succinat- und ATP-abhängigen Reaktionen ergibt sich eine Parallelität zur Wirkung am reversen Elektronentransport, wenn auch bei der Transhydrogenasereaktion mit Ausnahme des NPA etwas größere Konzentrationen erforderlich sind. AE-DNP erweist sich bei der Succinat-getriebenen Transhydrogenase als 5-fach, bei der ATP-abhängigen Reaktion als 3-fach dem HE-DNP überlegen.

Zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte Messungen mit anderen Schallpartikeln bestätigen die für AE-DNP und HE-DNP gefundenen Resultate größtenteils. Allerdings deuteten die Ergebnisse für HE-DNP weniger auf eine unterschiedliche Wirkung auf die Succinat- und ATP-stimulierte Transhydrogenasereaktion als vielmehr auf eine gleiche Wirkung auf beide Reaktionen hin. Insofern ist es möglich, daß die in Abb. 33 dargestellten zwei Inhibierungskurven für HE-DNP sich zu einer einzigen zusammenfügen lassen. Erschwerend für diese Interpretation war, daß bei späteren Messungen die Glutathionsreduktase eine erhebliche Aktivitätseinbuße aufwies, so daß die spezifische Aktivität der Transhydrogenase und folglich auch die prozentuale Inhibierungsrate mitunter stark schwankten. Die Werte sind daher hier nicht aufgeführt.

3.5.2.3 Ergänzende Untersuchungen

Versuche wurden durchgeführt, um mögliche Ursachen für die bei der Transhydrogenasereaktion gefundenen Resultate aufzuklären bzw. auszuschließen. Es wurde darauf geachtet, daß die Bedingungen der Transhydrogenasemessung eingehalten wurden.

Nicht energiegetriebene Transhydrogenase:

Jedem in 2.5.3 beschriebenen Ansatz wurden 5 μg Oligomycin zugesetzt, um eine Energisierung der in Gegenwart von ATP hergestellten Schallpartikel zu vermeiden. Oligomycin setzte dabei die Ausgangsaktivität um 5-10% herab. Pro Ansatz wurden 2-3 Konzentrationen eines Entkopplers getestet. Mit berücksichtigt wurde eine 10-20%ige Abnahme der Aktivität nach etwa 20 min Inkubationszeit. Alle eingesetzten Entkoppler sind in der Lage, die nicht-energiegetriebene Transhydrogenase, d.h. das Enzym selbst, zu inhibieren, wenn auch nicht in großem Umfang. So weisen 100 μM DNP eine Inhibierungsrate von 22%, 100 μM AE-DNP von 20% auf; die gleichen Konzentrationen HE-DNP und NPA inhibieren zu 12% bzw. 8% (Abb. 35). Dabei ist ersichtlich, daß in allen Fällen die Inhibierung einem Grenzwert, der etwa 75% der Ausgangsaktivität beträgt, zustrebt.

Beeinflussung der Succinatoxidaseaktivität:

Die Reduktion von Sauerstoff durch Succinat-getriebene Atmung in submitochondrialen Partikeln wurde in Anwesenheit von 10 μg Rotenon untersucht. Dabei wurde Atmungskontrolle festgestellt. Alle eingesetzten Entkoppler übten einen stimulierenden Einfluß auf die Succinatoxidase aus. Succinat wurde dabei in der Menge zugesetzt (10 mmol/mg Protein), daß es nicht begrenzend auf die Reaktionsgeschwindigkeit wirkte. Je nach Wirksamkeit des Entkopplers wurde die Aktivität des Enzyms bis zu 45% (AE-DNP) stimuliert. Abb. 36 zeigt das Ausmaß der Aktivierung abhängig von der Konzentration für HE-DNP, AE-DNP, NPA und DNP. AE-DNP erhöht den O_2 -Verbrauch bei einer Konzentration von 55 μM etwa 4 mal stärker (45% Stimulation) als HE-DNP (11% Stimulation). NPA wurde bei diesem Versuch nur in den bei der Transhydrogenasemessung verwendeten Konzentrationen geprüft. In ihrer spezifischen Wirksamkeit entsprechen alle Entkoppler den Erwartungen.

Die durchschnittliche spezifische Aktivität der Succinatoxidase aus 12 Messungen errechnet sich zu 0,246 $\mu\text{mol Succinat/min} \cdot \text{mg Protein}$ mit einer Standardabweichung von 12,43% und

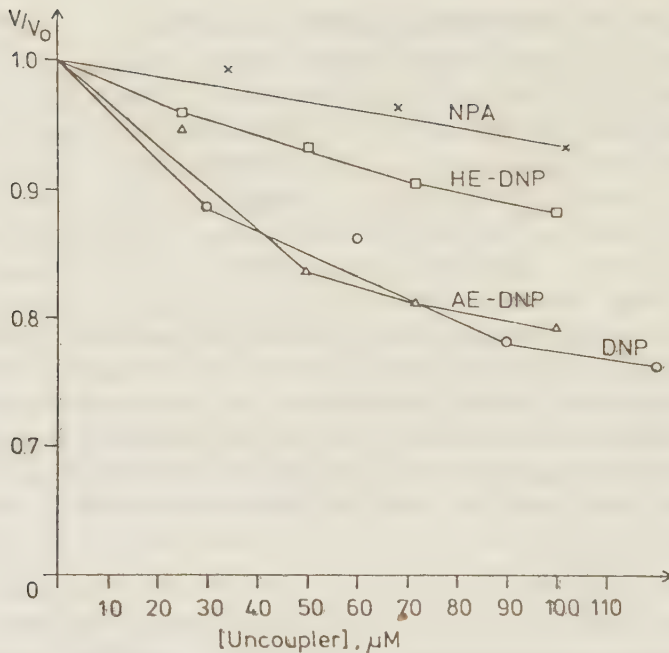


Abb. 35: Aktivitätsabnahme der nicht-energiegetriebenen Transhydrogenase nach Zugabe von AE-DNP (Δ), HE-DNP ($\square$), NPA (x) und DNP ($\circ$). SMP (0,4 mg/ml) wurden dazu in ein unter 2.5.3 beschriebenes Medium (+ Oligomycin) gegeben. Versuchstemperatur: 30°C

12,99% Abweichung vom wahren Mittelwert. Dabei wurde vorausgesetzt, daß 1 Mol Succinat 1 g atom O zu H_2O reduziert. Für die polarographischen Messungen war der Schreiber entsprechend 2.5.1 geeicht worden. Die Succinatoxidase besitzt somit etwa die 1,5-fache Aktivität der energiegetriebenen Transhydrogenase.

Einfluß auf die NADH-Oxidaseaktivität:

In den Versuchen ließ sich die Reduktion von Sauerstoff nach NADH-Gabe durch Zugabe von Entkopplern erheblich steigern, was eine noch gut funktionierende Atmungskontrolle in den ver-

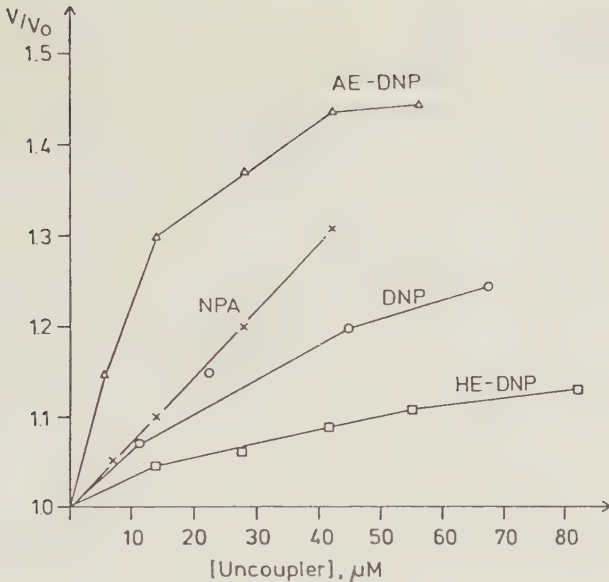


Abb. 36: Stimulation der Succinioxidase in submitochondrialen Partikeln nach Zugabe von AE-DNP (Δ), HE-DNP ($\square$), NPA ($\times$) und DNP ($\circ$) in %. SMP (0,5 mg/ml) wurden 1,7 ml Transhydrogenasepuffer (+ Rotenon) zugesetzt (s. 2.5.4). Zusatz: Succinat (3 mM). Versuchstemperatur: 30°C

wendeten Schallpartikeln anzeigt. NADH wurde hierbei im Überschuß verwandt (7,5 mmol/mg Protein), so daß die Reaktionsgeschwindigkeit bis zum Beginn anaerober Verhältnisse konstant blieb. Die durchschnittliche spezifische Aktivität der NADH-Oxidase aus 34 Messungen betrug 0,713 $\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg Protein}$ mit einer Standardabweichung von 15,3% und 15,53% vom wahren Mittelwert.

Wie aus Abb. 37 ersichtlich, ist die prozentuale Stimulation und damit die Entkopplung der NADH-getriebenen Atmung bei gleichen Entkopplerkonzentrationen etwa um die Hälfte geringer als die Stimulation der Succinat-getriebenen Atmung. Ein selektiver Einfluß auf die Succinioxidase ist hierbei eine mög-

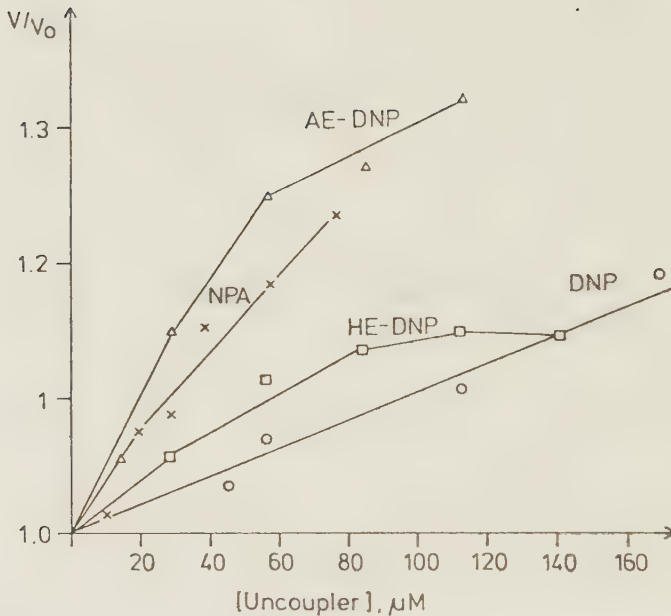


Abb. 37: Stimulation der NADH-getriebenen Atmungskontrolle in submitochondrialen Partikeln nach Zugabe von AE-DNP (Δ), HE-DNP ($\square$), NPA ($\times$) und DNP ($\circ$) in %. SMP (0,4 - 0,5 mg/ml) wurden zu 1,7 ml Transhydrogenasepuffer gegeben (s. 2.5.5). Zusatz: NADH (1,8 mM). Versuchstemperatur: 30°C

liche Erklärung der Vorgänge. Es ergibt sich gleichzeitig, daß die Atmungskontrolle in Schallpartikeln nur noch schwach funktioniert, da Entkoppler hier nur noch einen geringen Effekt ausüben. AE-DNP stimuliert die Atmung in Konzentrationen von 55 μM um 25%, HE-DNP in der gleichen Konzentration um 11%. DNP und NPA verhalten sich erwartungsgemäß, was ihre Wirksamkeit betrifft.

ATPase-Reaktion in Schallpartikeln:

Die Aktivitätsbestimmung der ATPase wurde in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems vorgenommen, da entstehendes ADP den Reaktionsablauf hemmt. Somit wurde eine lineare Reaktions-

geschwindigkeit erreicht. Erwartungsgemäß stimulieren alle eingesetzten vier Entkoppler die ATP-Hydrolyse (Abb. 38), und zwar zwischen 10% (HE-DNP) und 29% (AE-DNP) jeweils bei einer Konzentration von 50 μM . NPA wurde nur in den bei der Transhydrogenasemessung verwendeten Konzentrationen geprüft. Es fällt auf, daß mit steigender Konzentration das Ausmaß der Stimulation abnimmt (HE-DNP, DNP) oder zumindest ein Plateau erreicht (AE-DNP). Inwieweit darüber hinaus die ATPase bei hohen Konzentrationen inhibiert wird, wurde nicht weiter verfolgt, da es zur Klärung der Vorgänge bei der Transhydrogenasereaktion nicht beitrug. Im Versuch betrug die durchschnittliche spezifische Aktivität der ATPase 2,39 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ Protein (30°C), wobei 23 Messungen ausgewertet wurden, mit einer Standardabweichung von 12,7% und 13,0% Abweichung vom wahren Mittelwert. Vorausgesetzt wurde dabei, daß pro Mol hydrolysiertem ATP ein Mol NADH im gekoppelten Enzymversuch oxidiert wird. Für $\lambda = 366 \text{ nm}$ wurde ϵ mit $3,3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ angenommen. Verglichen mit der Succinatoxidase ist die Aktivität der ATPase etwa 10 mal größer; die Stimulation durch Entkoppler verhält sich hierbei sehr ähnlich.

3.5.2.4 ATP-Phosphat-Austausch

Die ATP-Phosphataustauschreaktion eignet sich, um entkoppelnde Substanzen näher zu spezifizieren (56), und wurde daher für die Substanzen AE-DNP und HE-DNP angewandt. Die Ergebnisse von zwei Meßreihen sind in Abb. 39 dargestellt. Auf der Ordinate angegeben ist die Radioaktivität der in 2 ml wässriger Phase enthaltenen AT^{33}P Menge gemessen in cpm. Subtrahiert wurde vorher eine gemessene Basisaktivität von 26 cpm durch Umfeldstrahlung. Die gemessene Radioaktivität (cpm) war infolge des ^{33}P -Zerfalls am 2. Meßtag geringer. Daher wurden alle Zählwerte zur Auftragung um den Faktor 1,515 erhöht, der das Verhältnis der Nullwerte (= Basisaktivität) an beiden Meßtagen widerspiegelt. Der Nullwert für den 2. Meßtag setzt sich hierbei aus dem Mittelwert zweier Bestimmungen zusammen. Der ATP-Phosphataustausch kann als eine Teilreaktion

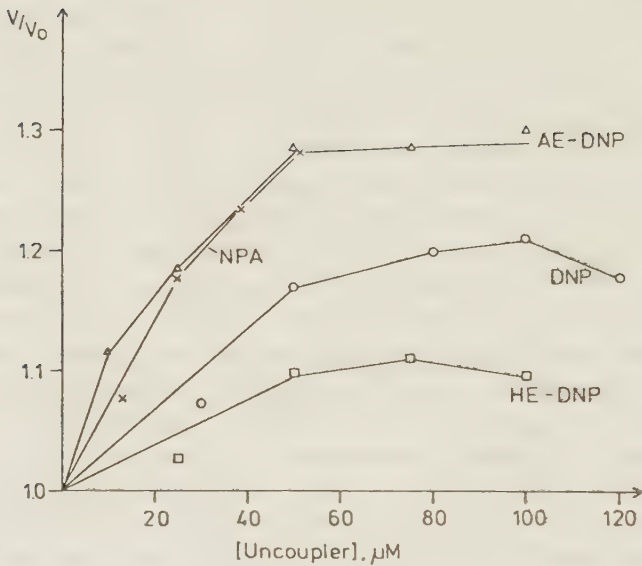


Abb. 38: Aktivität der ATPase in submitochondrialen Partikeln nach Zugabe von AE-DNP (Δ), HE-DNP ($\square$), NPA (x) und DNP (o) in % SMP (0,04 mg/ml) wurden in ein unter 2.5.6 beschriebenes Medium gegeben. Zusatz: ATP (2,5 mM). Versuchstemperatur: 30°C

der ATP-Bildung betrachtet werden. Er wird von an der ATPase angreifenden Entkopplern, so auch von AE-DNP und HE-DNP unterbunden. Die prozentuale Inhibierung durch AE-DNP war dabei an beiden Tagen gleich. Dagegen waren die Werte einer Meßreihe für HE-DNP nicht verwertbar. Die verbleibenden Werte liegen jedoch so günstig, daß eine Ermittlung des Wertes für $\phi_{1/2}$ möglich ist. 50% Inhibierung des Phosphataustausches ($=\phi_{1/2}$) werden durch 30 μM AE-DNP bzw. etwa 180 μM HE-DNP erreicht, d.h. AE-DNP wirkt hier etwa 6-fach stärker, was auch dem Gesamtverlauf der Kurve in Abb. 39 entspricht.

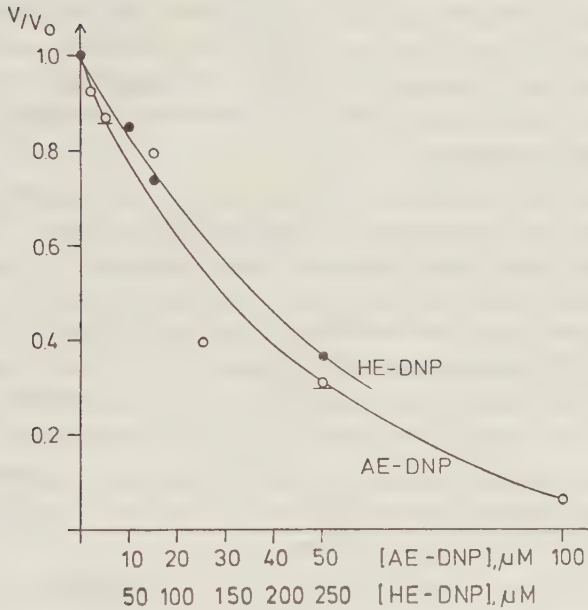


Abb. 39: Inhibierung des ATP - P_i -Austausches in submitochondrialen Partikeln durch HE-DNP (●) und AE-DNP (○). SMP (0,1 mg/ml) wurden in ein unter 2.5.7 beschriebenes Medium gegeben in Gegenwart von radioaktiv markiertem Phosphat. Zusatz: ATP (10 mM). Versuchstemperatur: 30°C. Weitere Vorgehensweise s. 2.5.7

3.6 Effekt von HE-DNP und AE-DNP auf die Protonenpermeabilität in Mitochondrien und Schallpartikeln

Die chemiosmotische Theorie schreibt dem durch den Elektronentransport induzierten Protonengradienten an der inneren mitochondrialen Membran die treibende Kraft bei der ATP-Synthese und damit die so wichtige Funktion der Kopplung von Substratoxidation und Phosphorylierung zu. Entkopplung wird hierbei als eine Erleichterung des H^+ -Konzentrationsausgleichs durch die Membran gesehen.

Abb. 40 zeigt den Kollaps eines durch einen Sauerstoffpuls erzeugten transmembranen H^+ -Gradienten (pH-Jump). Ausgewertet wurde der Abbau des Sauerstoffjumps abhängig von der Zeit. Hierbei muß noch das Ausmaß der in (114) beschriebenen Basislinienabweichung berücksichtigt werden (in Abb. 40 grob gestrichelte Linie), die nach Mitchell (125) durch langsame metabolische Prozesse im Mitochondrion zustandekommt. Für die Auswertung wurde daher diese Linie als Ausgangspunkt gewählt.

Abhängig von der zugesetzten Menge Entkoppler erhöht sich erwartungsgemäß die Protonenrückflußrate, was sich in einem schnelleren Abbau des pH-Jumps zeigt.

Dabei wurde der Peak wegen der zu großen Zeitkonstante des Schreibers nur unvollständig, d.h. zu klein, aufgezeichnet und bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Die gestrichelten Linien in Abb. 40 zeigen die wahrscheinlichen Verhältnisse.

Das Schwinden des pH-Gradienten wurde zeitabhängig ausgemessen und der Betrag (in mm) semilogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (nicht abgebildet). Aus der dabei erhaltenen Geraden ergibt sich für jede eingesetzte Entkopplerkonzentration eine entsprechende Konstante bezüglich der Protonenrückflußrate.

Diese Konstanten werden gegen die eingesetzte Konzentration der Entkoppler AE-DNP und HE-DNP aufgetragen (Abb. 42). Aus den hierbei erhaltenen beiden Geraden ist ersichtlich, daß HE-DNP und AE-DNP die Protonenpermeabilität in Mitochondrien in linearer Abhängigkeit von ihrer Konzentration erhöhen. Sub-

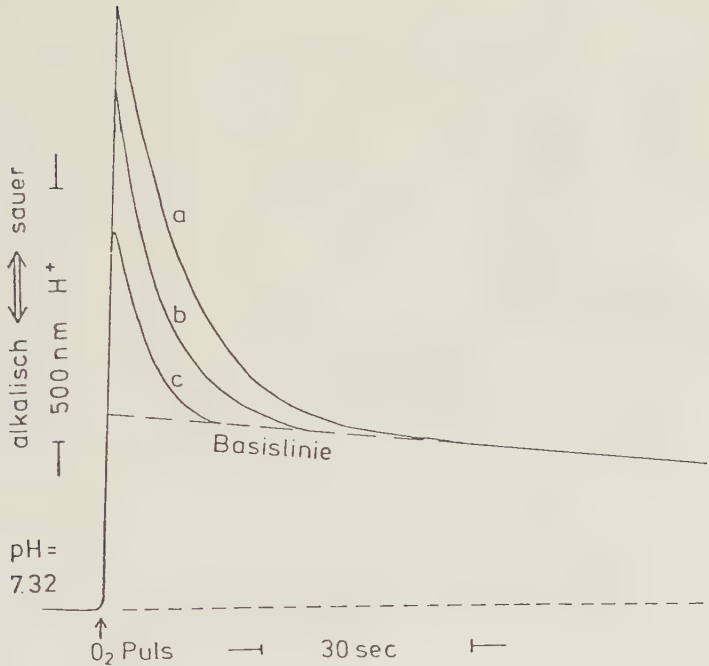


Abb. 40: Sauerstoffpulsexperiment an Rattenlebermitochondrien: a) unbeeinflusste Rate, b) durch $16 \mu\text{M}$ HE-DNP, c) durch $35 \mu\text{M}$ HE-DNP beschleunigter Protonenrückstrom. Auswertung s. Text. RLM (10,1 mg) wurden in 1,8 ml Basismedium (s. 2.5.8) gegeben (+ Succinat, Rotenon). Zusatz: $80 \mu\text{l}$ 0,25 M, mit Sauerstoff gesättigte Saccharoselösung. Versuchstemperatur: 30°C

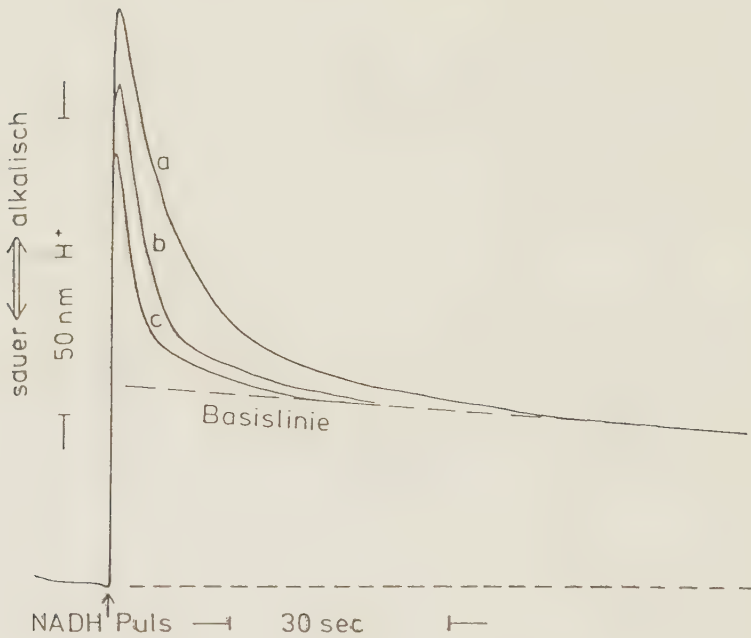


Abb. 41: NADH-Pulsexperiment an submitochondrialen Partikeln: a) unbeeinflusste Rate, b) durch 4,8 μM AE-DNP, c) durch 9,7 μM AE-DNP beschleunigter Protonenrückstrom. Auswertung s. Text. SMP (3,2 mg) wurden in 1,92 ml Basismedium (s. 2.5.9) gegeben (+ Oligomycin, Valinomycin). Zusatz: 25 μM NADH. Versuchstemperatur: 30°C

EFFECT OF AE-DNP AND HE-DNP ON PROTON PERMEABILITY IN MITOCHONDRIA

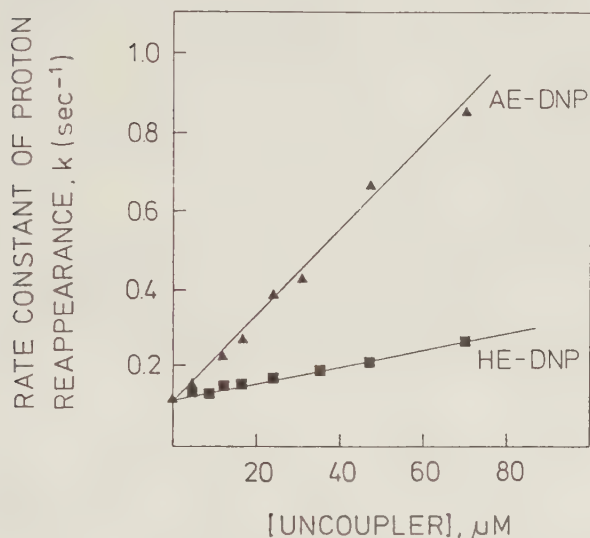


Abb. 42: Effekt von HE-DNP (■) und AE-DNP (▲) auf die Protonenpermeabilität in Mitochondrien. RLM (10,1 mg) wurden in 1,8 ml Basismedium (+ Succinat, Rotenon und Entkoppler in var. Mengen) gegeben (s. 2.5.8). Zusatz: 80 μl 0,25 M O_2 -gesättigte Saccharoselösung. Versuchstemperatur: 30°C . Die gestrichelte Linie gibt die Konstante der unbeeinflussten Protonenrückflußrate an.

trahiert man die Konstante der Protonenrückflußrate des unbeeinflussten Sauerstoffjumps, so ergibt sich bezogen auf Zeit und Konzentration für HE-DNP und $\Delta K_{\text{H}^+}/\Delta[\text{unc}]$ von $0,12 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, für AE-DNP ein $\Delta K_{\text{H}^+}/\Delta[\text{unc}]$ von $0,66 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, die in einem Verhältnis von 5,5 (AE-DNP/HE-DNP) zueinander stehen.

EFFECT OF-AE DNP AND HE-DNP ON PROTON PERMEABILITY IN SUBMITOCHONDRIAL PARTICLES.

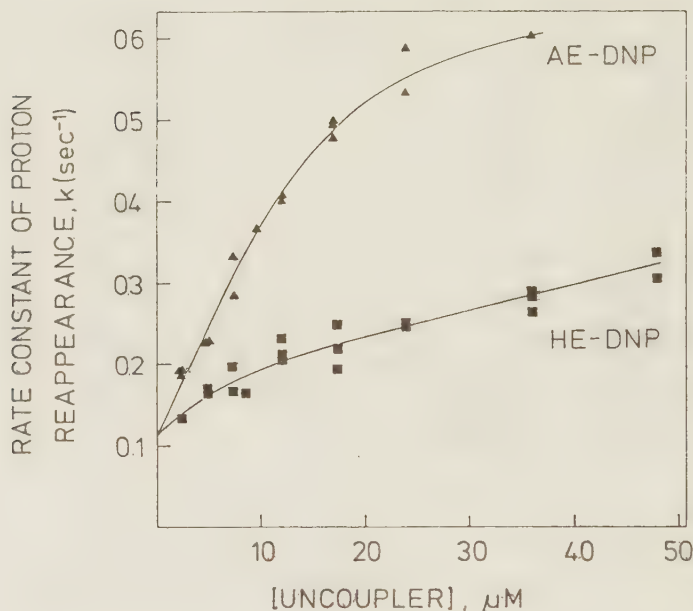


Abb. 43: Effekt von HE-DNP (■) und AE-DNP (▲) auf die Protonenpermeabilität in Schallpartikeln. SMP (3,2 mg) wurden in 1,92 ml Basismedium (+ Oligomycin, Valinomycin und Entkoppler in var. Mengen) gegeben (s. 2.5.9). Zusatz: 13 bzw. 50 μM NADH. Versuchstemperatur: 30°C. Die gestrichelte Linie gibt die Konstante der unbeeinflussten Protonenrückflußrate an.

100 μM HE-DNP stimulieren die Protonenrückflußrate um das 2,5- bis 3-fache, die entsprechende Menge AE-DNP dabei um das 10-fache gegenüber der Kontrolle. Berücksichtigt man die halbmaximale Entkopplungsrate für AE-DNP und HE-DNP bezogen auf die Succinat- bzw. β -Hydroxybutyrat-getriebene Atmungskontrol-

le ($\phi_{1/2} = 9 - 12 \mu\text{M}$ bzw. $130 - 170 \mu\text{M}$), so beträgt die dabei erwirkte Erhöhung der Protonenpermeabilität lediglich das 2-fache (AE-DNP) bzw. das 3,5- bis 4-fache (HE-DNP) der unbeeinflussten Rate, wobei letzterer Wert extrapoliert ist.

NADH-Pulsexperimente an submitochondrialen Partikeln wurden in gleicher Weise ausgewertet wie die oben beschriebenen. Abb. 41 zeigt den Kollaps eines durch NADH-Puls ($12,5 \mu\text{M}$ NADH) erzeugten pH-Gradienten. Dabei wird infolge Alkalisierung des Mediums gegen Ende eine langsamere Abbaurate vorgetäuscht (im Versuch nicht mehr ausgewertet), und es scheint zunächst, daß der Gradient nicht ganz abgebaut wird. Eine solche Alkalisierung wird jedoch nicht durch den vektoriellen Fluß von Protonen an der Membran sondern durch Abnahme der skalaren Protonen infolge der Substratoxidation verursacht. Beispielsweise kann die Oxidation von NADH nach folgender Gleichung zur Alkalisierung des umgebenden Mediums führen:



Wegen der unvollständigen Peak-Aufzeichnung konnten AE-DNP nur bis $36 \mu\text{M}$, HE-DNP bis $96 \mu\text{M}$ eingesetzt werden. Die im 5 mV -Bereich aufgezeichneten NADH-Jumps waren im Verhältnis ausgeprägter und besser auszuwerten.

Die bei der Auswertung erhaltenen einzelnen konzentrationsabhängigen Konstanten für die Protonenwiederaufnahme sind in Abb. 43 jeweils für AE-DNP und HE-DNP wiedergegeben. Sie verlaufen nicht linear wie in Abb. 42. Der Konstanten $\Delta K_{\text{H}^+}/\Delta[\text{unc}]$ wurde daher jeweils die anfängliche Steigung zugrundegelegt. $\Delta K_{\text{H}^+}/\Delta[\text{unc}]$ beträgt für HE-DNP $0,66 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, für AE-DNP $1,62 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. AE-DNP stimuliert die Protonenwiederaufnahme somit 2,5 mal stärker. Dieses Verhältnis bleibt auch bei größeren Konzentrationen erhalten. Gemessen an Mitochondrien ist die Protonenpermeabilität in Schallpartikeln gleich, die Erhöhung der Rate durch Entkoppler auch in höheren Konzentrationen jedoch stärker ausgeprägt. Besonders HE-DNP vermag, verglichen mit der Wirkung an Mitochondrien, in geringeren Mengen bereits den Protonenrückstrom zu stimulieren, während

er sich oberhalb von 50 μM nur wenig erhöht. Bezogen auf die halbentkoppelnde Wirkung an der Transhydrogenase ($\emptyset_{1/2} = 28 - 38 \mu\text{M}$ für AE-DNP bzw. 112 - 146 μM für HE-DNP) erhöht sich dabei die Protonenpermeabilität um das 5-fache (AE-DNP) bzw. das 4,5- bis 6-fache (HE-DNP) der unbeeinflussten Rate, wobei letzterer Wert extrapoliert ist.

3.7 Einwirkung auf den elektrochemischen Protonengradienten (Membranpotential und Protonengradient)

$\Delta\psi$ - und ΔpH -Messungen dienten der Frage nach einem unterschiedlichen Einfluß von HE-DNP und AE-DNP auf die Teilkomponenten der protonentreibenden Kraft sowie der Frage, inwieweit dies mit der unterschiedlichen Wirkung der Entkoppler auf die energiegetriebene Transhydrogenase korreliert.

Polyenfarbstoffe der Oxonolklasse sind im physiologischen Bereich Anionen und können daher abhängig von einem erzeugten Membranpotential im Innern von submitochondrialen Partikeln akkumulieren. Bei diesem Vorgang tritt eine Spektralverschiebung zum Licht größerer Wellenlänge ein, deren Ursache zum einen in einer dem Nernst'schen Potential folgenden, ungleichmäßigen Verteilung, zum anderen in einer möglichen Anreicherung an der nach Energisierung stärker positiv geladenen Innenseite der inneren Membran gesehen wird (126). Oxonolfarbstoffe sind somit für Membranpotentialmessungen an Schallpartikeln gut geeignet (115).

Abb. 44 zeigt die energieabhängige Absorptionzunahme von Oxonol VI in Schallpartikeln. Aufgetragen ist die Differenz der Absorption bei 630 nm und bei 602 nm als optische Dichte gegen die Zeit. Dazu wurde vorher das Absorptionsspektrum des Farbstoffes sowie dessen Veränderung abhängig von der Energisierung in einem größeren Wellenlängenbereich aufgezeichnet und der isosbestische Punkt bei 602 nm sowie der Punkt größter Differenz bei 630 nm analog (116) festgelegt (nicht abgebildet hier). Das Ausmaß der energiegekoppelten Oxonolantwort

ENERGY-DEPENDENT ABSORBANCE INCREASE OF OXONOL-VI IN SMP



Abb. 44: Energieabhängige Absorptionszunahme von Oxonol VI in submitochondrialen Partikeln. Oxonol VI ($1 \mu\text{M}$) und SMP ($0,1 \text{ mg/ml}$) wurden in Transhydrogenasepuffer (s. 2.5.3) aufgenommen. Absorptionsänderungen wurden bei $630 - 602 \text{ nm}$ verfolgt. Zusätze: ATP ($5 \mu\text{M}$), Succinat (1 mM), NADH ($0,5 \text{ mM}$), CCCP ($20 \mu\text{M}$). Versuchstemperatur: 30°C

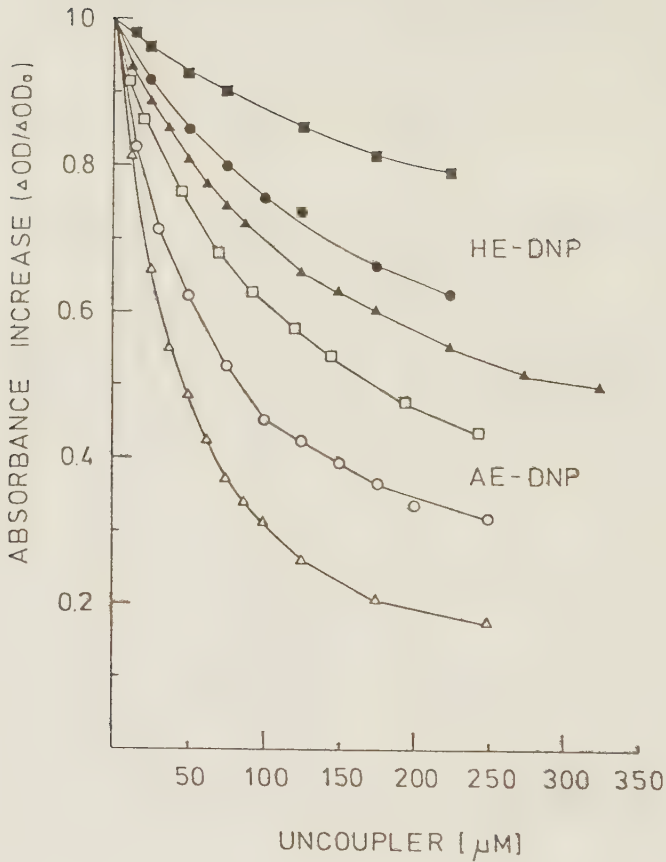


Abb. 45: Einfluß von HE-DNP (ausgefüllte Symbole) und AE-DNP (offene Symbole) auf die energieabhängige Absorptionsänderung von Oxonol VI in Gegenwart von 0,5 mM NADH (□, ■), 5 mM ATP (○, ●) und 1 mM Succinat (Δ, ▲). Bedingungen wie in Abb. 44

hängt von dem Verhältnis Membranprotein zu Oxonolkonzentration ab (116) und wurde daher mit $1\text{ }\mu\text{M}$ Oxonol VI und $0,1\text{ mg/ml}$ SMP so gewählt, daß das Farbstoffsignal nicht gesättigt war und sowohl auf Erhöhung als auch auf Erniedrigung des Membranpotentials antworten konnte. Ebenso ist von Bedeutung, daß mit steigender Proteinkonzentration die Oxonolantwort infolge der Lichtstreuung schwächer wird. Bei den Versuchen waren die Oxonol VI-Absorptionsänderungen sowohl bei der Succinat- bzw. NADH-induzierten Atmung als auch bei ATP-Hydrolyse gleich (s. Abb. 44). $20\text{ }\mu\text{M}$ CCCP sind hierbei in der Lage, augenblicklich das entstandene Membranpotential abzubauen. Ebenso sprechen die Absorptionsänderungen sehr gut auf Valinomycin + K^+ an (nicht in der Abb. gezeigt).

AE-DNP und HE-DNP verhalten sich in diesem System gleichsinnig. Die erwartete eigene Absorption der beiden Entkoppler im nahen Rotbereich zeigte sich darin, daß nach vollständiger Entkopplung durch CCCP ein von der zugesetzten Menge abhängiger Restbetrag der Oxonolantwort verblieb, der dann entsprechend subtrahiert wurde. Von beiden Entkopplern wird die Succinat-induzierte Absorptionsänderung des Oxonols mehr beeinflusst als die mit ATP energisierte Reaktion (Abb. 45), obwohl die anfängliche Absorptionsänderung in beiden Fällen gleich ist. Die NADH-induzierte Reaktion wird dagegen am geringsten entkoppelt. Diese Effekte sind nicht auf HE-DNP und AE-DNP begrenzt. Die chemisch nahe verwandten Stoffe NPA, DNP und auch Picrat verhalten sich, was ihre Wirkung auf das Membranpotential betrifft, sehr ähnlich (Kiehl, persönliche Mitteilung). Es ist daher anzunehmen, daß die mit ATP und noch mehr die mit Succinat erzeugte protonentreibende Kraft $\Delta\mu$ geringer ist, so daß Entkoppler hier effektiver wirken können, ein Zusammenhang, der bereits von Tsou und van Dam (120) beschrieben worden ist.

50% Absorptionsänderung (630 - 602 nm) treten bei AE-DNP in Konzentrationen von $47\text{ }\mu\text{M}$ (Succinat-), $85\text{ }\mu\text{M}$ (ATP-) und $170\text{ }\mu\text{M}$ (NADH-getragene Reaktion) auf, während sich für HE-DNP $305\text{ }\mu\text{M}$ für die Succinat- bzw. $450\text{ }\mu\text{M}$ als extrapolierter Wert für die

ATP-induzierte Reaktion ergeben. AE-DNP wirkt insofern etwa 6-fach stärker auf das Membranpotential in beiden Fällen. Ebenso bedeutsam ist, daß die bei der Transhydrogenasemesung beobachtete Abhängigkeit der Entkopplung von der Art der Energisierung für AE-DNP und NPA wiederum zutrifft, für HE-DNP allerdings eher in entgegengesetzter Weise.

pH-Gradientmessungen: Fluoreszierende Aminoacridinfarbstoffe, darunter besonders ACMA, sprechen gut auf ΔpH -sensitive Veränderungen in Membranen an (118). So folgt der Energisierung von submitochondrialen Partikeln eine Abnahme der Fluoreszenz (quenching), die mit dem Aufbau eines pH-Gradienten einhergeht. Aminoacridine liegen im physiologischen Bereich als Kationen vor. Ursache der Fluoreszenzabnahme ist entweder eine Akkumulation im Innern der Partikel, sei es infolge des elektrischen Potentials, oder als osmotischer Ausgleich des entstandenen Protonengradienten, oder infolge Anheftung an negativ geladene Gruppen an der Membranninnenseite (118).

Abb. 46 zeigt, daß nach Energisierung von Schallpartikeln durch ATP oder Succinat die Fluoreszenz des Acridinderivates ACMA abnimmt. Zugabe von dem nicht fluoreszierenden Entkoppler TTFB wiederum bewirkt eine Fluoreszenzzunahme, was einem Abbau des transmembranen Protonengradienten gleichkommt. Das ursprüngliche Niveau wird infolge des quenching von ATP hierbei nicht erreicht (Abb. 46). Ebenso spricht die Fluoreszenz des ACMA stark auf Nigericin + K^+ an (in der Abb. nicht gezeigt), während Valinomycin + K^+ die ACMA-Antwort nur wenig beeinflusst.

Die verschiedenen Wirkungsweisen von HE-DNP und AE-DNP auf den transmembranen Protonengradienten sind in Abb. 47 zu sehen und sind den bei der Transhydrogenasereaktion beobachteten ähnlich (s. Abb. 33). Die dargestellten Kurven sind hierbei jeweils um die Absorptionsminderung durch die beiden Entkoppler selbst korrigiert. Dabei wurde experimentell ein Korrekturfaktor abhängig von der zugesetzten Konzentration ermittelt, der eine lineare Abhängigkeit aufwies (nicht abgebildet), Infolge des quenching durch AE-DNP und HE-DNP kann-

ENERGY-DEPENDENT FLUORESCENCE QUENCHING OF ACMA IN SMP.

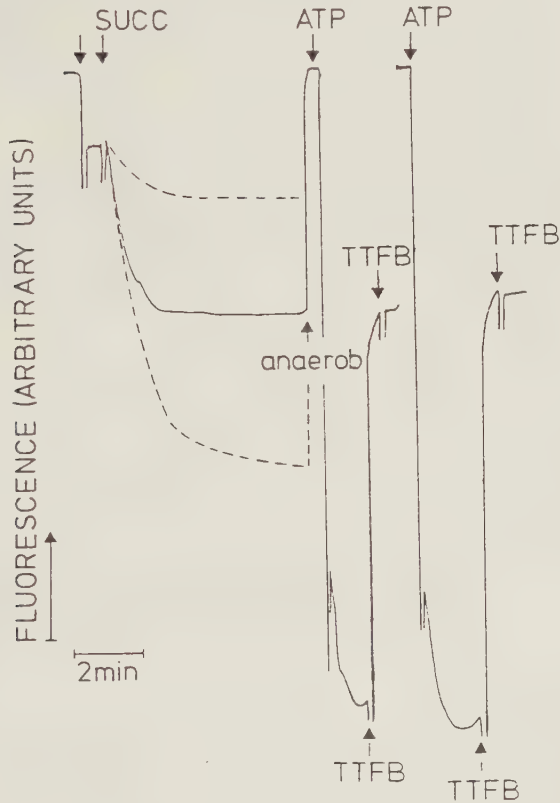


Abb. 46: Energieabhängige Fluoreszenzabnahme von ACMA in submitochondrialen Partikeln. ACMA ($0,5 \mu\text{M}$) und SMP ($0,33 \text{ mg/ml}$) wurden in Transhydrogenasepuffer (s. 2.5.3) aufgenommen. Fluoreszenzänderungen wurden bei 480 nm Emissions- und 410 nm Exzitationswellenlänge aufgezeichnet. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Spannbreite der Fluoreszenzabnahme nach Succinatgabe. Zusätze: ATP (2 mM), Succinat (4 mM), TTFB ($8 \mu\text{M}$). Versuchstemperatur: 30°C

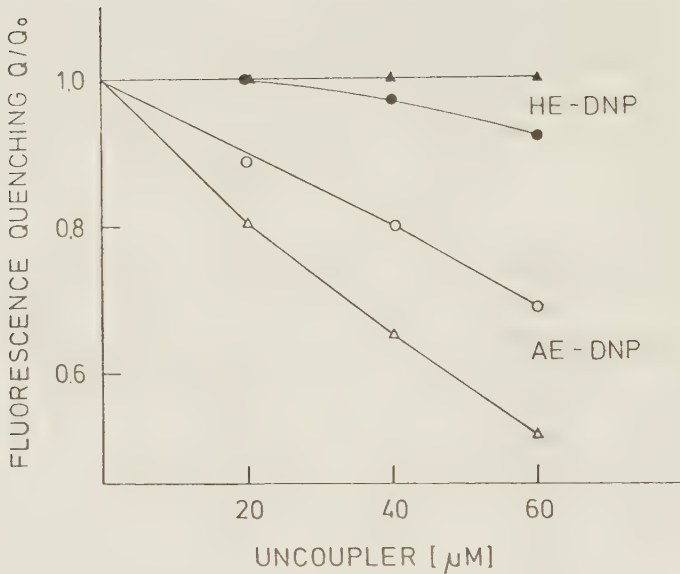


Abb. 47: Einfluß von HE-DNP (ausgefüllte Symbole) und AE-DNP (offene Symbole) auf die energieabhängige ACMA-Fluoreszenzabnahme in Gegenwart von 2 mM ATP (○, ●) und 4 mM Succinat (△, ▲). Bedingungen wie in Abb. 46

ten die Entkoppler nur bis ca 60 μM aufgezeichnet werden. Während AE-DNP die ΔpH -gekoppelte Fluoreszenzabnahme der Succinat-getriebenen Reaktion stärker aufhebt als die der ATP-getriebenen Reaktion, geschieht bei HE-DNP das Umgekehrte. Dies ist überraschend, da das Ausmaß des ACMA-Fluoreszenzquenching bei Succinat-induzierter Energisierung (in Abb. 46 gestrichelte Linie) variabel ist, jedoch immer geringer als bei der ATP-induzierten Reaktion. HE-DNP hat in den höchsten, experimentell möglichen Mengen (60 μM) keinen Effekt auf die Succinat-abhängige ACMA-Antwort. Die in Tabelle 8 angegebenen Werte für $\phi_{1/2}$ sind aus Abb. 47 extrapoliert und betragen für AE-DNP 61 μM (Succinat) bzw. 98 μM (ATP) sowie etwa 230 μM (ATP) für HE-DNP. Für die Succinat-abhängige Reaktion ist da-

bei keine Extrapolation möglich. AE-DNP baut somit den pH-Gradienten in submitochondrialen Partikeln in der ATP-getriebenen Reaktion etwa 2,5-fach stärker ab als HE-DNP.

3.8 Zusammenfassender Vergleich der Eigenschaften von AE-DNP und HE-DNP

Tabelle 7: Einfluß von AE-DNP und HE-DNP auf die ACMA-Fluoreszenzrate und das Absorptionsverhalten von Oxonol VI bei Konzentrationen, die 50% Entkopplung der energieabhängigen Transhydrogenasereaktion hervorrufen

	Abnahme der ACMA- Fluoreszenzrate	Oxonol VI Absorp- tionszuwachs
AE-DNP, 28 μ M (Succinat)	74 %	66 %
38 μ M (ATP)	80 %	67 %
HE-DNP, 146 μ M (Succinat)	- ^a	63 %
112 μ M (ATP)	80 % ^b	74 %

a) Extrapolation nicht möglich

b) Extrapoliert

Tabelle 8: Vergleich der Eigenschaften von AE-DNP und HE-DNP

Molekulare Eigenschaften	AE-DNP	HE-DNP	$Q \frac{A^a}{H}$
pK _a	4,0	4,2	0,95
Octanol/Wasser-Verteilungs- koeffizient	47	17	2,8
Anzahl der Hydroxylgruppen	1	2	0,5
Dipolmoment (Seitenkette ^b)	1,78	1,69	1,05
Dissoziationskonstante, spezifische Bindung an RLM (μM)	12	40	1/3,3

Effekt auf energieabhängige Reaktionen in submitochondr. Part.

Ø _{1/2} (μM, bei 50% Entkopplung)			
Reverser Elektronentransport	7	40	5,7
Transhydrogenase- (Succinat)	28	146	5,2
aktion (ATP)	38	112	2,9
Einfluß auf die ACMA-Fluores- zenzrate (Succinat)	61 ^c	- ^d	-
(ATP)	98 ^c	230 ^c	2,3
Einfluß auf die Oxonol VI- Absorption (Succinat)	47	305	6,5
(ATP)	85	430 ^c	5,1
ATP-P _i -Austausch	35	175	5,0
Δk _H + / [unc], (min ⁻¹ · μM ^{-1e})	1,62	0,66	2,5
% Aktivierung bei 55 μM:			
ATPase	29	10	2,9
Succinatoxidase	45	11	4,1

Effekt auf energieabhängige Reaktionen in Mitochondrien

Ø _{1/2} (μM, bei 50% Entkopplung)			
Atmungskontrolle (Succinat)	9	130	14,4
(β-Hydroxybutyrat)	12	173	14,4
ATP/O-Quotient (Succinat)	15	170	11,3
(β-Hydroxybutyrat)	14	145	10,4
k _H + / [unc], (min ⁻¹ · μM ^{-1e})	0,66	0,12	5,5

a) Verhältnis der Werte für AE-DNP und HE-DNP

b) Ref. 119

c) Extrapoliert

d) Extrapolation nicht möglich

e) Anfangssteigung aus Abb. 42 und 43

4. DISKUSSION

Die beiden Entkoppler HE-DNP und AE-DNP sind nicht nur chemisch betrachtet zwei neue, bisher nicht angewandte Substanzen, sondern sie sind auch geeignet dazu beizutragen, neue Erkenntnisse über den Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung zu gewinnen. Die in der Arbeit durchgeführte Vorgehensweise steht dabei in Einklang mit der häufig praktizierten Anwendung von Antibiotika und anderen Hemmstoffen sowie von Entkopplern und deren chemischen Modifikationen auf Teile der Atmungskette oder der Phosphorylierungsseite, in der Absicht, deren Funktion besser zu verstehen.

Die chemische Synthese bietet für sich allein genommen bereits interessante Aspekte, da hier neben den erwähnten beiden Entkopplern eine größere Anzahl von Nebenprodukten entsteht. Dabei dürfte es sich entweder um Substanzen mit Nitro- oder Acetylgruppen in unterschiedlicher Position oder auch um Dimere handeln, die möglicherweise aus zwei über die endständige Alkoholgruppe der Seitenkette miteinander kondensierten Molekülen entstanden sind.

Was die Wirkungsweise der beiden Entkoppler betrifft, so ergibt sich aus Tabelle 8, daß AE-DNP infolge der Acetylierung einen Zuwachs bezüglich der Lipophilität um das 2,8-fache gegenüber HE-DNP erfährt, was auch mit einer 3,3-fach höheren Affinität für die Entkopplerbindungsstelle einhergeht. In sub-mitochondrialen Partikeln wirkt AE-DNP effektiver auf energieabhängige Reaktionen, und zwar um einen Faktor zwischen 2,5 und 5,7, was den Erwartungen aufgrund der chemischen Struktur entspricht. Dagegen wird in Mitochondrien die Atmungskontrolle und die oxidative Phosphorylierung von HE-DNP 10- bis 15-fach schwächer entkoppelt als von AE-DNP. Dies ist teilweise überraschend und kann mit der zusätzlichen Hydroxylgruppe im HE-DNP-Molekül allein nicht erklärt werden. Auffallend ist ferner die nur geringe Erhöhung der Protonen-permeabilität bei halbmaximaler Entkopplung der Succinat- bzw. β -Hydroxybutyrat-abhängigen Atmung (AE-DNP: 2-fache;

HE-DNP: 3-4-fache Erhöhung gegenüber der state 4-Atmung). Sie steht im Gegensatz zur geforderten etwa 10-fachen Permeabilitätserhöhung für eine protonophoretisch erklärbare Entkopplerwirkung, die im Bereich der Protonenflußdichte bei state 3-Atmung liegt (125). Diese konnte zwar für etwa halbkoppelnde Mengen von DNP und FCCP gemessen werden (125), hingegen nicht für Pikrat (127).

Wesentlicher noch als die vorangestellten Feststellungen ist jedoch die unterschiedliche Wirkung der Entkoppler auf die energieabhängige Transhydrogenase in submitochondrialen Partikeln. Während HE-DNP die ATP-getriebene Transhydrogenase leichter oder wenigstens ebenso stark inhibiert wie die Succinat-getriebene, trifft für AE-DNP das Umgekehrte zu, da hier die Succinat-getriebene Transhydrogenase stärker inhibiert wird (Abb. 33). Die unterschiedliche Lipophilität der Substanzen sowie das Bindungsverhalten an der Entkopplerbindungsstelle können diese Beobachtungen allein nicht erklären (vgl. Tab. 8). Einen Hinweis, daß Entkoppler die ATP-getriebene Transhydrogenase stärker entkoppeln können, hat Ernster am Beispiel des DNP zu zeigen versucht (122). Van Dam fand allerdings zur selben Zeit gerade für DNP keinen Unterschied (128), was in Einklang mit eigenen Resultaten steht (Abb. 34). Daher wird die Diskussion im folgenden sich der Frage annehmen, warum in der Transhydrogenasereaktion die Entkopplung durch AE-DNP, HE-DNP, durch NPA und DNP hier Unterschiede zeigt, abhängig von der Art der Energisierung, obwohl im allgemeinen der Abbau eines gemeinsamen energiereichen Zwischenprodukts angenommen wird.

Erste Aufmerksamkeit wurde der Durchführung der Transhydrogenasemessungen gewidmet. Da es bekannt ist, daß das Ausmaß der Entkopplung von der Atmungsrate abhängt (120), könnten daraus resultierende starke Abweichungen der Transhydrogenaseaktivitäten die Ergebnisse wenigstens teilweise erklären. Durch Vergleich der Enzymaktivitäten an allen Versuchstagen (s. Tab. 5) konnte sichergestellt werden, daß die Transhydrogenase intakt und erwartungsgemäß funktionierte.

In Übereinstimmung mit Ernster (111) wurde ein leichter Unterschied zwischen der Aktivität der Succinat-getriebenen ($0,202 \pm 0,017 \mu\text{mol NADP/min}\cdot\text{mg Protein}$) und der ATP-getriebenen Transhydrogenase ($0,189 \pm 0,017 \mu\text{mol NADP/min}\cdot\text{mg Protein}$) gefunden, der allerdings nur 6% der Gesamtaktivität ausmacht. Ferner waren sowohl ATP (2,5 mM) als auch Succinat (5 mM) in ausreichender Konzentration vorhanden. Schließlich wurde darauf geachtet, daß Versuchsbedingungen einheitlich waren. Lösungen der beteiligten Reaktanden wurden in der Regel am Versuchstag frisch angesetzt. Die zeitweilige Verwendung von Phosphatpuffer zur Lösung der beiden Entkoppler zeigte ebenfalls keine meßbaren Auswirkungen auf das Enzymsystem. Wegen einer möglichen Nebenwirkung von Zyanid, die für die Messung eines solchen Effektes verantwortlich sein könnte (122, 128), wurde ein anderer Inhibitor der Atmungskette, nämlich Rotenon, für beide Arten der Energisierung benutzt. Es wurde kein ATPase-Inhibitor, wie z.B. Oligomycin, verwendet, da kein merklicher Effekt auf die Succinat-getriebene Transhydrogenase zu sehen war. Das Reaktionsmedium war daher abgesehen von den verschiedenen Substraten für beide Energisierungsarten gleich.

Eine Abhängigkeit von der Art der Energisierung wird ebenfalls für die Membranpotentialmessungen mit dem Farbstoff Oxonol VI beobachtet. Das sichtbare Spektrum dieser Substanz reagiert gut auf Membranpotentialänderungen (115, 129) und wird erwartungsgemäß durch Nigericin + Valinomycin + K^+ oder Valinomycin + K^+ beeinflusst, während Nigericin + K^+ keinen Effekt ausübt. Rottenberg (130) vergleicht mehrere Methoden der Membranpotentialmessungen. Danach wird die Messung mit optischen Proben lediglich von der quantitativ etwas genaueren, aber wesentlich komplizierteren Ionenverteilungsmessung mit Hilfe von ^{86}Rb in Gegenwart von Valinomycin übertroffen. Im Gegensatz zu Abb. 33 wird sowohl für HE-DNP als auch für AE-DNP das durch die Succinat-getriebene Reaktion erzeugte Membranpotential stärker abgebaut. Dies gilt auch für NPA und DNP. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Absorptionsänderungen des Oxonols unter Bedingungen gemessen wurden, unter

denen die spektrale Antwort aufgrund der günstigen Oxonolkonzentration optimal auf Vorgänge an der Membran ansprach. Ferner ist im Experiment der Betrag der Absorptionsänderung jeweils für jede erprobte Art der Energisierung gleich (Abb. 44), was auch den Beobachtungen bei der Transhydrogenasereaktion entspricht. Ein Unterschied bezüglich der Entkopplerempfindlichkeit des Succinat- bzw. ATP-abhängigen Membranpotentials muß daher eine andere Ursache haben. In der Tat besteht eine etwa 10-fache Differenz zwischen den spezifischen Aktivitäten der die Energisierung einleitenden Enzyme. So entfaltet die Succinatoxidase unter den entsprechenden Versuchsbedingungen eine Aktivität von $0,24 \mu\text{mol/min} \cdot \text{mg Protein}$, während die ATPase $2,4 \mu\text{mol ATP/min} \cdot \text{mg Protein}$ umsetzt. Daher ist es möglich, daß der Energiepool durch Succinatoxidation nicht so schnell gespeist wird wie durch ATP-Hydrolyse, so daß geringere Konzentrationen von Entkopplern ausreichen, einen bestimmten Entkopplungsgrad zu erreichen. Diese kinetische Annahme ist ähnlich, aber nicht identisch mit früheren Beobachtungen, daß die Wirksamkeit von Entkopplern mit abnehmender Atmungsrate zunimmt (120). Somit ließen sich zumindest die gleichsinnige Wirkung von AE-DNP und NPA auf Membranpotential und Transhydrogenasereaktion erklären. Für HE-DNP und DNP kann jedoch diese Annahme nicht zutreffen, da diese Substanzen die ATP-getriebene Transhydrogenase, allerdings nicht die Oxonol VI-Antwort genauso oder sogar mehr (HE-DNP) inhibieren als die Succinat-getriebene Reaktion. Der Unterschied zwischen HE-DNP und AE-DNP könnte daher statt in einer anderen Wirkung auf das Membranpotential in einer unterschiedlichen Wirkung auf den pH-Gradienten liegen. So gleicht das Muster der energieabhängigen ACMA-Fluoreszenzabnahme (Abb. 45) dem der Transhydrogenasemessung (Abb. 33). Die Änderung der Fluoreszenzausbeute des Farbstoffs ACMA ist als qualitativer Indikator eines pH-Gradienten beschrieben worden (118) und reagierte im Experiment stark auf Nigericin + K^+ , aber nur kaum auf Valinomycin + K^+ . Auch hier ist die Messung der Verteilung von [^{14}C] DMO (5,5-Dimethyl-2,4-oxazolidin-dion) noch präziser und zudem frei von möglichen Interaktionen mit der

Membran oder beteiligten Enzymen (130), jedoch wäre ihre Durchführung in diesem Rahmen zu aufwendig gewesen. Die Succinat-induzierte ACMA-Fluoreszenzabnahme wird bereits bei geringeren AE-DNP Konzentrationen rückgängig gemacht als die ATP-induzierte Reaktion. Für HE-DNP trifft hier das Umgekehrte zu. In der Succinat-induzierten Reaktionen zeigt HE-DNP in der höchsten experimentell möglichen Konzentration sogar überhaupt keinen Effekt auf den erzeugten pH-Gradienten. Dies ist überraschend, da mit Succinat die ACMA-Fluoreszenzabnahme unterschiedlich, jedoch immer geringer als die mit ATP erzeugte ist, was damit der oben ausgeführten kinetischen Annahme entspricht. Die Abhängigkeit der Entkopplung der Transhydrogenasereaktion von der Art der Energisierung wird somit durch Experimente mit spektralen Indikatoren für pH-Gradient und Membranpotential bestätigt. Für HE-DNP ist außerdem die Wirkung auf den Protonengradienten bedeutsam, da er nur wenig oder im Fall der Succinat-getriebenen Reaktion überhaupt nicht beeinflusst wird, und zwar in Konzentrationen, in denen andere energieabhängige Reaktionen bereits teilweise entkoppelt sind, so z.B. der reverse Elektronentransport. Es ist daher fraglich, ob Entkopplung allein als reiner protonophoretischer Vorgang im Sinne der chemiosmotischen Hypothese aufgefaßt werden kann. Vielmehr scheint es möglich zu sein, daß Entkoppler unterschiedlich auf die Teilkomponenten der protonentreibenden Kraft wirken können. Dies trifft vor allem für HE-DNP zu, das ähnlich dem Pikrat (127) hauptsächlich auf das Membranpotential einwirkt.

Zusammenfassend scheinen folgende Eigenschaften für eine Entkopplung durch Phenolderivate wichtig zu sein (vgl. Tab. 8):

- eine elektronegativ substituierte Molekülstruktur,
- ein relativ niedriger pK-Wert,
- eine hohe Lipophilität,
- ein mitunter unterschiedlich ausgeprägter Einfluß auf den transmembranen Protonengradienten ΔpH und auf das Membranpotential $\Delta\psi$,

- wahrscheinlich eine direkte Einwirkung auf die ATP-Synthase durch Wechselwirkung mit der Entkopplerbindungsstelle.

Letzterer bisher nicht diskutierte Punkt stützt sich zu einem auf Beobachtungen am isolierten Komplex V, an dem ATPase-Stimulierung sowie Inhibierung des ATP-Phosphat-Austausches gemessen werden können, ohne daß andere mitochondriale Strukturen, z.B. Komplexe der Atmungskette, Membranen, Carrier-Proteine hier Einfluß gewinnen, zum anderen auf der von Hanstein nachgewiesenen spezifischen Wechselwirkung mit einer Entkopplerbindungsstelle. Nach jüngsten Ergebnissen (131) scheint diese ausschließlich auf der α -Untereinheit von F_1 zu liegen, während Proteinbanden im Bereich 10 kDalton (DCCD-bindendes Protein) und 30 kDalton (Entkopplerbindendes Protein, ADP/ATP carrier) im Gegensatz zu früheren Annahmen (53, s.a. Abb. 8) Entkoppler nur in unspezifischer Bindung tragen. Es ist denkbar, daß eine solcherart erfolgte Bindung an $F_1\alpha$ über eine mögliche Konformationsänderung Einfluß auf den Protonenkanal im Innern nehmen kann.

Weitgehend ungeklärt bleibt in dieser Richtung die Bedeutung eines in Wilsons Labor mit dem Entkoppler N_3CCP kovalent markierten 10 - 15 kDalton Proteolipids, das im OS-ATPase-Komplex vorhanden ist (132).

Über die Bedeutung der Entkopplerbindungsstelle für den Prozeß der Entkopplung selbst herrscht zur Zeit noch Unklarheit. Unterstützung in dieser Interpretationsrichtung wird durch eine nachlassende Evidenz in Hinblick auf eine reine protonophoretische Funktion der Entkoppler gewährt. Angesichts der Tatsache, daß die innere mitochondriale Membran nur zu ca. 30% aus Phospholipiden besteht (2), die zudem asymmetrisch orientiert sind (3-5), dagegen zu gut 70% aus Proteinen besteht, bleibt die durch Versuche an künstlichen Doppelmembranen erhärtete chemiosmotische Theorie der Entkopplung noch in Frage gestellt. Versuche mit einem membranimpermeablen Entkoppler können in dieser Hinsicht zur Klärung beitragen, da sie nur in Schallpartikeln, nicht jedoch in Mitochondrien mit der Entkopplerbindungsstelle in Wechselwirkung treten können. Die

Synthese des HE-DNP ist in dieser Richtung ein erster Schritt, der nun, wie bereits in der Einleitung angedeutet, durch Addition von hydrophilen Gruppen an die Seitenkette weitergeführt werden kann.

Eine Klärung des Mechanismus der Entkopplung und damit zusammenhängend der Arbeitsweise der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien ist nicht zuletzt dadurch von Bedeutung, daß Entkopplung sowohl bei neugeborenen Säugetieren als auch darüber hinaus bei Winterschläfern eine physiologische Rolle spielt, nämlich zur Wärmezeugung in braunem Fettgewebe. Dieser Mechanismus konnte in den letzten Jahren einigermaßen geklärt werden und resultiert in der Schaffung eines protonendurchlässigen Kanals durch die innere Membran, wodurch Atmung und ATP-Synthese entkoppelt werden (133). Dieser Protonenkanal kann durch Purinnukleotide, besonders GDP, blockiert werden, die sich dazu spezifisch an ein beteiligtes 32 kDalton Protein, das Entkopplungsprotein, binden. Das Entkopplungsprotein konnte inzwischen in Klingenberg's Labor isoliert werden (134) und liegt im physiologischen Zustand wahrscheinlich als Dimer vor (135). Schließlich spielt auch der hohe Gehalt an endogenen, ungesättigten Fettsäuren eine Rolle. Ihre physiologische Funktion als Entkoppler ist jedoch bestritten (133).

Aus dem Beispiel der Regulation der Thermogenese im braunen Fettgewebe ergeben sich möglicherweise Parallelen bezogen auf die Mitochondrienfunktion in übrigen Geweben. Stockdale und Selwyn konnten zeigen, daß verschiedene Nukleotide als Substrate die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol auf die isolierte ATPase beeinflussen, und zwar in kompetitiver Weise in Hinblick auf die Wirkung an anderen Enzymen (136). So ist auch hier über Nukleotide ein physiologischer Regulationsmechanismus denkbar, der die ATP-Synthese und damit auch die Wärmezeugung kontrolliert.

Ein besseres Verständnis des Prinzips der oxidativen Phosphorylierung könnte nicht zuletzt auch der Schlüssel für die Deutung einer Reihe wahrscheinlich hierin begründeter Erscheinungen sein. Dazu zählen die Wirkung von Trijodthyronin (T_3) auf

Mitochondrien (137), die einiger Antirheumatika (138) und Antiarrhythmika (139) sowie einige noch nicht näher definierte Formen mitochondrialer Myopathien (140). Die Klärung dieser Fragen wird vom medizinischen Aspekt her auf diesem Gebiet von Bedeutung sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von dem Konzept eines Entkopplers mit zusätzlichen Hydroxylgruppen zur Minderung der Membrandurchlässigkeit wurden zwei neue Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung synthetisiert: 2,4-Dinitro-6(2'-hydroxyethyl)-phenol (HE-DNP) und 2,4-Dinitro-6(2'-acetoxyethyl)-phenol (AE-DNP). Beide Entkoppler unterscheiden sich in einer alkoholischen Hydroxylgruppe, sind aber bezüglich der Struktur, des Dipolmoments und der Säurestärke ähnlich. Die erhöhte Lipophilität (2,8-fach) und die gesteigerte Affinität für die Entkopplerbindungsstelle (3,3-fach) des AE-DNP ist daher in der zusätzlichen Acetylgruppe begründet. In submitochondrialen Partikeln wirkt AE-DNP auf alle energieabhängigen Reaktionen stärker, und zwar um einen Faktor zwischen 2,3 und 6,5. Noch ausgeprägter ist dieses Verhalten in Mitochondrien, wo sich HE-DNP, besonders was die Entkopplung der Atmungskontrolle betrifft, als 9-15-fach schwächer erweist.

Überraschend ist die unterschiedliche Wirkung auf die energiegetriebene Transhydrogenase. Während AE-DNP, wie auch NPA, die Succinat-getriebene Reaktion leichter entkoppeln als die ATP-getriebene, trifft für HE-DNP das Umgekehrte zu; für DNP ergibt sich hier kein Unterschied. Unter sonst gleichen Bedingungen können naheliegende kinetische Annahmen, die die etwas unterschiedliche Aktivität der Transhydrogenase (202 nmol NADH/min · mg Protein in der Succinat-getriebenen und 190 nmol NADH/min · mg Protein in der ATP-getriebenen Reaktion) oder den in der Tat 10-fachen Unterschied in der Aktivität der die Reaktion einleitenden Enzyme berücksichtigen (Succinat-oxidase: 0,24 μ mol/min · mg Protein; ATPase: 2,4 μ mol/min · mg Protein), diesen Effekt allein nicht erklären.

Die Wirkung auf die energieabhängige Oxonol VI-Absorptionsänderung als quantitativer Indikator des Membranpotentials erfolgt für die beiden hergestellten Entkoppler in gleicher Weise, d.h. in beiden Fällen wird die Succinat-induzierte Oxonol VI-Antwort stärker inhibiert als die durch ATP erzeugte. Hingegen gleicht das Bild des unterschiedlichen Einflusses auf

die ΔpH -abhängige ACMA-Fluoreszenzabnahme dem der Wirkung auf die Transhydrogenasereaktion. Abschließend betrachtet lassen sich die beobachteten Effekte auf die energieabhängige Transhydrogenasereaktion in etwa so deuten: Für die im allgemeinen leichter zu entkoppelnden Succinat-abhängigen Vorgänge mögen die oben angeführten kinetischen Erklärungen zutreffen. Für die andersartige Wirkung des HE-DNP auf die Transhydrogenasereaktion schließlich ist hierbei mehr der unterschiedliche Einfluß auf den pH-Gradienten zu sehen als der auf das Membranpotential.

Auffallend ist ferner, daß beide Entkoppler, vor allem HE-DNP, eher auf das Membranpotential einwirken als auf den pH-Gradienten. Dies zeigt sich auch in Mitochondrien, wo die Protonendurchlässigkeit der Membran nicht in dem Ausmaß erhöht wird, wie es für eine Entkopplung infolge eines ΔpH -Kollapses notwendig wäre. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise überraschend und stehen damit im Gegensatz zur bisherigen, ausschließlich protonophoretisch begründeten Wirkung von Entkopplern auf die oxidative Phosphorylierung.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) CLAUDE, A. (1947-1948)
The Harvey Lectures 43, 121-231.
- 2) HINKLE, P.C., MCCARTY, R.E.: How Cells make ATP
Scientific Am. 3/1978, 104-123.
- 3) HARB, J.S., COMTE, J., GAUTHERON, D.C.: Asymmetrical
Orientation of Phospholipids and Their Interactions
with Marker Enzymes in Pig Heart Mitochondrial Inner
Membrane (1981)
Arch. Biochem. Biophys. 208, 305-318.
- 4) CRAIN, R.C., MARINETTI, G.V.: Phospholipid Topology of
the Inner Mitochondrial Membrane of Rat Liver (1971)
Biochemistry 18, 2407-2414.
- 5) KREBS, J.J.R., HAUSER, H., CARAFOLI, E.: Asymmetric
Distribution of Phospholipids in the Inner Membrane
of Beef Heart Mitochondria (1979)
J. Biol. Chem. 254, 5308-5316.
- 6) VON JAGOW, G., ENGEL, W.D.: Struktur und Funktion des
energieumwandelnden Systems der Mitochondrien (1980)
Angew. Chem. 92, 684-700.
- 7) MITCHELL, P.: Chemiosmotic Coupling in Oxidative and
Photosynthetic Phosphorylation (1966)
Biol. Rev. 41, 445-502.
- 8) AZZONE, G.F., POZZAN, T., DI VIRGILIO, F.: H^+ /Site,
Charge/Site, and ATP/Site Ratios at Coupling Site III
in Mitochondrial Electron Transport (1979)
J. Biol. Chem. 254, 10206-10212.
- 9) POZZAN, T., MICONI, V., DI VIRGILIO, F., AZZONE, G.F.:
 H^+ /Site, Charge/Site, and ATP/Site Ratios at Coupling
Sites I and II in Mitochondrial Electron Transport
(1979)
J. Biol. Chem. 254, 10200-10205.
- 10) AZZONE, G.F., POZZAN, T., BRAGADIN, M., MICONI, V.:
Thermodynamics and Kinetics of the H^+ Pump in Mitochon-
drial Electron Transport (1979)
J. Biol. Chem. 254, 10213-10219.

- 11) KIEHL, R.: Die Wirkung von Thiol- und Sulfensäurereagentien wachsender Alkylkettenlänge auf die mitochondriale Energieübertragung (1977)
Dissertationsarbeit.
- 12) MITCHELL, P.: David Keilins Konzept der Atmungskette und dessen chemiosmotische Konsequenzen (1979)
Angew. Chem. 91, 718-733.
- 13) MITCHELL, P.: Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemiosmotic Type of Mechanism (1961)
Nature 191, 144-148.
- 14) VON JAGOW, G., ENGEL, W.D.: A Model for the Cytochrome b Dimer of the Ubiquinol: Cytochrome c Oxidoreductase as a Proton Translocator (1980)
FEBS Lett. 111, 1-5.
- 15) HATEFI, Y., HANSTEIN, W.G., GALANTE, Y., STIGALL, D.L.: Mitochondrial ATP-P_i Exchange Complex and the Site of Uncoupling of Oxidative Phosphorylation (1975)
Fed. Proc. 34, 1699-1709.
- 16) RACKER, E.: A New Look at Mechanisms in Bioenergetics (1976)
Academic Press, New York, 118-119.
- 17) SENIOR, A.E.: The Structure of Mitochondrial ATPase (1973)
Biochim. Biophys. Acta 301, 249-277.
- 18) SENIOR, A.E.: Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. Location of Sulfhydryl Groups and Disulfide Bonds in the Soluble Enzyme from Beef Heart (1975)
Biochemistry 14, 660-664.
- 19) BAIRD, B.A., HAMMES, G.G.: Chemical Cross-Linking Studies of Beef Heart Mitochondrial Coupling Factor 1 (1977)
J. Biol. Chem. 252, 4743-4748.
- 20) PENEFSKY, H.S.: ATPases Associated with Electron Transport (1979)
Meth. Enzym. 55, 297-303.

- 21) KAGAWA, Y.: Reconstitution of the Energy Transformer, Gate, and Channel Subunit Reassembly, Crystalline ATPase, and ATP Synthesis (1978)
Biochim. Biophys. Acta 505, 45-93.
- 22) HARRIS, D.A.: The Interactions of Coupling ATPase with Nucleotides (1978)
Biochim. Biophys. Acta 463, 245-273.
- 23) WAGENVOORD, R.J., VAN DER KRAAN, I., KEMP, A.: Specific Photolabeling of Beef Heart Mitochondrial ATPase by 8-Azido-ATP (1977)
Biochim. Biophys. Acta 460, 17-24.
- 24) LUNARDI, I., LAUQUIN, G.L.M., VIGNAIS, P.: Interaction of Azidonitrophenylaminobutyl-ADP, a Photoaffinity ADP-Analog, with Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. Identification of the Labeled Subunits (1977)
FEBS Lett. 80, 317-323.
- 25) ESCH, F.S., ALLISON, W.S.: Identification of a Tyrosine Residue at a Nucleotide Binding Site in the β -Subunit of the Mitochondrial ATPase with p-Fluorosulfonyl [^{14}C]-benzoyl-5-adenosine (1978)
J. Biol. Chem. 253, 6100-6106.
- 26) PULLMAN, M.E., MONROY, G.C.: A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase (1963)
J. Biol. Chem. 238, 3761-3769.
- 27) GALANTE, Y.M., WONG, S.-Y., HATEFI, Y.: Mitochondrial Adenosinetriphosphatase Inhibitor Protein: Reversible Interaction with Complex V (ATP Synthetase Complex) (1982)
Biochemistry 20, 2671-2678.
- 28) PEDERSEN, P.L.: Mitochondrial Adenosine Triphosphatase (1975)
Bioenergetics 6, 243-275.
- 29) BERDEN, J.A., HENNEKE, M.A.C.: The Uncoupler-Binding Protein in the Proton-Pumping ATPase from Beef Heart Mitochondria (1981)
FEBS Lett. 126, 211-214.
- 30) SANADI, D.R., JOSHI, S.: Coupling Factors - An Overview (1979)
Meth. Enzym. 55, 380-383.

- 31) KIEHL, R.: Is There Nucleotide Carrier Present in Oligomycin-Sensitive ATPase Preparations? (1980)
FEBS Lett. 109, 280-282.
- 32) GAY, N.J., WALKER, J.E.: The ATP Operon: Nucleotide Sequence of the Region Encoding the α -Subunit of Escherichia Coli ATP Synthase (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 2187-2194.
- 33) SARASTE, M., GAY, N.J., EBERLE, A., RUNSWICK, M.J., WALKER, J.E.: The ATP Operon: Nucleotide Sequence of the Gens for the γ -, β -, and ϵ -Subunits of Escherichia Coli ATP Synthase (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 5287-5296.
- 34) GAY, N.J., WALKER, J.E.: The ATP Operon: Nucleotide Sequence of the Promoter and the Gens for the Membrane Proteins, and the δ -Subunit of Escherichia Coli ATP Synthase (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 3919-3926.
- 35) VAN DAM, K., POSTMA, P.W.: The ATPase Complex from Energy Transducing Membranes
TIBS Jan. 1976, 16-17.
- 36) LA NOUE, K.F., SCHOOLWERTH, A.C.: Metabolite Transport in Mitochondria (1979)
Ann. Rev. Biochem. 48, 871-922.
- 37) EARLE, S.R., FISHER, R.: Reconstitution of Bovine Heart Mitochondrial Transhydrogenase: A Reversible Proton Pump (1980)
Biochemistry 19, 562-569.
- 38) MITCHELL, P., MOYLE, J.: Evidence Discriminating Between the Chemical and the Chemiosmotic Mechanisms of Electron Transport Phosphorylation (1965)
Nature 208, 1205-1206.
- 39) SLATER, E.C.: Measurement and Importance of Phosphorylation Potentials: Calculation of Free Energy of Hydrolysis in Cells (1979)
Meth. Enzym. 55, 235-245.
- 40) ERNSTER, L.: Chemical and Chemiosmotic Aspects of Electron Transport-Linked Phosphorylation (1977)
Ann. Rev. Biochem. 46, 981-995.

- 41) MITCHELL, P.: Vectorial Chemiosmotic Processes (1977)
Ann. Rev. Biochem. 46, 996-1005.
- 42) BOYER, P.D.: Oxidative Phosphorylation (1968)
in: Biological Oxidations, SINGER, T.P. (ed.), Inter-
science Publishers, 193-235.
- 43) SLATER, E.C.: Oxidative Phosphorylation (1966)
Comprehensive Biochem. 14, 327-396.
- 44) RYRIE, I.J., JAGENDORF, A.T.: Correlation Between a
Conformational Change in the Coupling Factor Protein
and the High Energy State in Chloroplasts (1972)
J. Biol. Chem. 247, 4453-4459.
- 45) RYDSTRÖM, J., TEIXEIRA DA CRUZ, A., ERNSTER, L.:
Factors Governing the Kinetics and Steady State of
the Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase System
(1970)
Eur. J. Biochem. 17, 56-62.
- 46) HATEFI, Y., YAGI, T., PHELPS, D.C., WONG, S.-Y., VIK,
S.B., GALANTE, Y.M.: Substrate Binding Affinity Changes
in Mitochondrial Energy-Linked Reactions (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 79, 1756-1760.
- 47) BOYER, P.D.: Coupling Mechanisms in Capture, Trans-
mission, and Use of Energy (1977)
Ann. Rev. Biochem. 46, 957-966.
- 48) WILLIAMS, R.J.P.: The Multifarious Couplings of Energy
Transduction (1978)
Biochim. Biophys. Acta 505, 1-44.
- 49) STOREY, B.T., LEE, C.-P., WIKSTRÖM, M.: Is Transmem-
brane $\Delta\mu\text{H}^+$ Essential to Mitochondrial Energy Coupling?
TIBS Juli 1981, 166-170.
- 50) STOREY, B.T., SCOTT, D.M., LEE, C.-P.: Energy-Linked
Quinacrine Fluorescence Changes in Submitochondrial
Particles from Skeletal Muscle Mitochondria (1980)
J. Biol. Chem. 255, 5224-5229.
- 51) WITT, H.T., SCHLODDER, E., GRÖBER, P.: Membrane-Bound
ATP Synthesis Generated by an External Electrical Field
(1976)
FEBS Lett. 69, 272-276.

- 52) KELL, D.B.: On the Functional Proton Current Pathway of Electron Transport Phosphorylation - An Electrodeic View (1979)
Biochim. Biophys. Acta 549, 55-99.
- 53) HANSTEIN, W.G.: Uncoupling of Oxidative Phosphorylation (1976)
Biochim. Biophys. Acta 456, 129-148.
- 54) LARDY, H.A., ELVEHJEM, C.A.: Biological Oxidations and Reductions (1945)
Ann. Rev. Biochem. 14, 1-30.
- 55) LOOMIS, W.F., LIPMANN, F.: Reversible Inhibition of the Coupling Between Phosphorylation and Oxidation (1948)
J. Biol. Chem. 173, 807-808.
- 56) HEYTLER, P.G.: Uncouplers of Oxidative Phosphorylation (1979)
Meth. Enzym. 55, 462-472.
- 57) KABACK, H.R., REEVES, J.P., SHORT, S.A., LOMBARDI, F.J.: Mechanisms of Active Transport in Isolated Bacterial Membrane Vesicles - XVIII: The Mechanism of Action of Carbonyl-cyanide-m-Chlorophenylhydrazone (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 160, 215-222.
- 58) HANSTEIN, W.G., HATEFI, Y.: Characterisation and Localisation of Mitochondrial Uncoupler Binding Sites with an Uncoupler Capable of Photoaffinity Labeling (1974)
J. Biol. Chem. 249, 1356-1362.
- 59) CHAN, S.H.P., HIGGINS, E.: Uncoupling Activity of Endogenous Free Fatty Acids in Rat-Liver Mitochondria (1978)
Can. J. Biochem. 56, 111-116.
- 60) MATSUOKA, J., NAKAMURA, T.: Reversible Effects of Fatty Acids on Respiration, Oxidative Phosphorylation, and Heat Production of Rat-Liver Mitochondria (1979)
J. Biochem. (Tokyo) 86, 675-681.
- 61) DE DEKEN, R.H.: Relations Entre la Structure Moléculaire et le Pouvoir Inhibiteur des Nitro- et Halophénols (1955)
Biochim. Biophys. Acta 17, 494-502.

- 62) HEMKER, H.C.: Lipid Solubility as a Factor Influencing the Activity of Uncoupling Phenols (1962)
Biochim. Biophys. Acta 63, 46-54.
- 63) PARKER, V.H.: Uncouplers of Rat Liver Mitochondrial Oxidative Phosphorylation (1965)
Biochem. J. 97, 658-662.
- 64) WHITEHOUSE, M.W.: Biochemical Properties of Anti-inflammatory Drugs (1964)
Biochem. Pharmacol. 13, 319-336.
- 65) HANSCH, C., KIEHS, K., LAWRENCE, G.L.: The Role of Substituents in the Hydrophobic Bonding of Phenols by Serum and Mitochondrial Proteins (1965)
J. Am. Chem. Soc. 87, 5770-5773.
- 66) FUJITA, T.: The Analysis of Physiological Activity of Substituted Phenols with Substituent Constants (1966)
J. Med. Chem. 9, 797-803.
- 67) FUJITA, T., JUNKICHI, I., HANSCH, C.: A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients (1964)
J. Am. Chem. Soc. 86, 5175-5180.
- 68) CUNARRO, J., WEINER, M.W.: Mechanism of Action of Agents which Uncouple Oxidative Phosphorylation: Direct Correlation Between Proton-Carrying and Respiratory-Releasing Properties Using Rat Liver Mitochondria (1975)
Biochim. Biophys. Acta 387, 234-240.
- 69) TERADA, H.: Some Biochemical and Physicochemical Properties of the Potent Uncoupler SF 6847 (3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzylidenemalononitrile) (1975)
Biochim. Biophys. Acta 387, 519-522.
- 70) BAKKER, E.P., VAN DEN HEUVEL, E.J., WIECHMANN, A.H.C.A., VAN DAM, K.: A Comparison Between the Effectiveness of Uncouplers of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria and in Different Artificial Membrane Systems (1973)
Biochim. Biophys. Acta 292, 78-87.
- 71) HOPFER, U., LEHNINGER, A.L., THOMPSON, T.E.: Protonic Conductance across Phospholipid Bilayer Membranes Induced by Uncoupling Agents for Oxidative Phosphorylation (1968)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 59, 484-490.

- 72) TING, H.P., WILSON, D.F., CHANCE, B.: Effects of Uncouplers of Oxidative Phosphorylation on the Specific Conductance of Bimolecular Lipid Membranes (1970)
Arch. Biochem. Biophys. 141, 141-146.
- 73) WILSON, D.F., TING, H.P., KOPPELMAN, M.S.: Mechanism of Action of Uncouplers of Oxidative Phosphorylation (1971)
Biochemistry 10, 2897-2902.
- 74) LIBERMAN, Y.A., TOPALY, V.P., TSOFINA, L.M., JASAITIS, A.A., SKULACHEV, V.P.: Mechanism of Coupling of Oxidative Phosphorylation and the Membrane Potential of Mitochondria (1969)
Nature 222, 1076-1078.
- 75) FINKELSTEIN, A.: Weak-Acid Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. Mechanism of Action on Lipid Membranes (1969)
Biochim. Biophys. Acta 205, 1-6.
- 76) MCLAUGHLIN, S.: The Mechanism of Action of DNP on Phospholipid Bilayer Membranes (1972)
J. Membr. Biol. 9, 361-372.
- 77) FOSTER, M., MCLAUGHLIN, S.: Complexes Between Uncouplers of Oxidative Phosphorylation (1974)
J. Membr. Biol. 17, 155-180.
- 78) CHEN, W.L., HSIA, J.C.: Studies on Motional Characteristics and Distribution of Protonated and Anionic Forms of Spin-Labeled 2,4-Dinitrophenol in Phospholipid Bilayer Membranes (1974)
Biochemistry 13, 4948-4952.
- 79) VERMA, S.P., SCHNEIDER, H., SMITH, J.C.P.: Organisational Changes in Phospholipid Multibilayers Induced by Uncouplers of Oxidative Phosphorylation: A Spin Label Study (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 154, 400-406.
- 80) KESSLER, R.J., TYSON, C.A., GREEN, D.E.: Mechanism of Uncouplers in Mitochondria: Uncouplers as Ionophores for Cycling Cations and Protons (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73, 3141-3145.

- 81) KESSLER, R.J., VANDE ZANDE, H., TYSON, C.A., BLONDIN, G.A., FAIRFIELD, J., GLASSER, P., GREEN, D.E.: Uncouplers and the Molecular Mechanism of Uncoupling in Mitochondria (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 74, 2241-2245.
- 82) GREEN, D.E., VANDE ZANDE, H.: Mechanism of Uncoupling by Uncouplers of Oxidative Phosphorylation (1981)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 100, 1017-1024.
- 83) COHEN, F.S., EISENBERG, M., MCLAUGHLIN, S.: The Kinetic Mechanism of Action of an Uncoupler of Oxidative Phosphorylation (1977)
J. Membr. Biol. 37, 361-396.
- 84) VAN DAM, K., SLATER, E.C.: A Suggested Mechanism of Uncoupling of Respiratory-Chain Phosphorylation (1967)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 2015-2019.
- 85) KRAAYENHOF, R., VAN DAM, K.: Interaction Between Uncouplers and Substrates in Rat-Liver Mitochondria (1969)
Biochim. Biophys. Acta 172, 189-197.
- 86) HÜLSMANN, W.C.: Over het Mechanisme von de Ademhalingsketenphosphorylering (1958)
M.D. Theris, Klein Offset Drukkerij, Amsterdam.
- 87) HEMKER, H.C.: Inhibition of Adenosine Triphosphatase and Respiration of Rat-Liver Mitochondria by Dinitrophenols (1964)
Biochim. Biophys. Acta 81, 1-8.
- 88) WENNER, C.E.: Succinate Oxidation by Mouse Liver Mitochondria (1965)
Fed. Proc. 24, 544-551.
- 89) WILSON, D.F., MERZ, R.D.: Inhibition of Mitochondrial Respiration by Uncouplers of Oxidative Phosphorylation (1967)
Arch. Biochem. Biophys. 119, 470-476.
- 90) STOCKDALE, M., SELWYN, M.J.: Effects of Ring Substituents on the Activity of Phenols as Inhibitors and Uncouplers of Mitochondrial Respiration (1971)
Eur. J. Biochem. 21, 565-574.

- 91) WEINBACH, E.C., GARBUS, J.: The Interaction of Uncoupling Phenols with Mitochondria and with Mitochondrial Protein (1965)
J. Biol. Chem. 240, 1811-1819.
- 92) WEINBACH, E.C., GARBUS, J.: Mechanism of Action of Reagents that Uncouple Oxidative Phosphorylation (1969)
Nature 221, 1016-1018.
- 93) MARGOLIS, S.A., LENAZ, G., BAUM, H.: Stoichiometric Aspects of the Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by Carbonyl Cyanide Phenylhydrazones (1967)
Arch. Biochem. Biophys. 118, 224-230.
- 94) MURUOKA, S., TERADA, H.: 3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzylidenemalononitrile; a New Powerful Uncoupler of Respiratory-Chain Phosphorylation (1972)
Biochim. Biophys. Acta 275, 271-275.
- 95) TERADA, H., VAN DAM, K.: On the Stoichiometry Between Uncouplers of Oxidative Phosphorylation and Respiratory Chains: The Catalytic Action of SF 6847 (3,5-Di-Tert-Butyl-4-Hydroxybenzylidenemalononitrile) (1975)
Biochim. Biophys. Acta 387, 507-518.
- 96) HANSTEIN, W.G., HATEFI, Y.: Trinitrophenol: A Membrane Impermeable Uncoupler of Oxidative Phosphorylation (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 288-292.
- 97) LEADER, J.E., WHITEHOUSE, M.W.: Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by some Salicylanilide Derivatives (1966)
Biochem. Pharmacol. 15, 1379-1387.
- 98) PHELPS, D.C., HANSTEIN, W.G.: The Effect of Tetraphenylborate on Mitochondrial Energy Transduction (1977)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 79, 1245-1254.
- 99) DUTTON, G.G.S., BRIGGS, T.I., BROWN, B.R., HILLMAN, M.E. D.: Characterisation of Dinitroalkyl Phenols (1953)
Can. J. Chem. 31, 685-687.
- 100) HANSTEIN, W.G., HATEFI, Y., KIEFER, H.: Radiochemical Synthesis and Photochemical Properties of the Uncoupler 2-Azido-4-Nitrophenol, a Versatile Photoaffinity Labeling Reagent (1979) -
Biochemistry 18, 1019-1025.

- 101) ALBERT, A., SERJEANT, E.P.: The Determination of Ionisation Constants (1971)
2nd ed., Chapman and Hall, London.
- 102) GORNALL, A.G., BORDWILL, C.J., DAVID, M.M.: Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction (1949)
J. Biol. Chem. 177, 751-766.
- 103) JACOBS, E.E., JACOB, M., SANADI, D.R., BRADLEY, L.B.: Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by Cadmium Ion (1956)
J. Biol. Chem. 223, 147-156.
- 104) TZAGOLOFF, A., PENEFSKY, H.S.: Extraction and Purification of Lipoprotein Complexes from Membranes (1971)
Meth. Enzym. 22, 219-230.
- 105) KASCHNITZ, R.M., HATEFI, Y., MORRIS, H.P.: Oxidative Phosphorylation Properties of Mitochondria Isolated from Transplanted Hepatoma (1976)
Biochim. Biophys. Acta 449, 224-235.
- 106) SMITH, A.L.: Preparations, Properties, and Conditions for Assay of Mitochondria: Slaughterhouse Material, Small-Scale (1967)
Meth. Enzym. 10, 81-86.
- 107) BLAIR, P.V.: The Large-Scale Preparation and Properties of Heart Mitochondria from Slaughterhouse Material (1967)
Meth. Enzym. 10, 81-86.
- 108) LÖW, H., VALLIN, I.: Succinate-Linked Diphosphopyridine Nucleotide Reduction in Submitochondrial Particles (1963)
Biochim. Biophys. Acta 69, 361-374.
- 109) HANSEN, M., SMITH, A.: Studies on the Mechanism of Oxidative Phosphorylation: VII. Preparation of a Submitochondrial Particle (ETP_H) Which is Capable of Fully Coupled Oxidative Phosphorylation (1964)
Biochim. Biophys. Acta 81, 214-222.

- 110) ESTABROOK, R.W.: Mitochondrial Respiratory Control and the Polarographic Measurement of ADP: O Ratios (1967) Meth. Enzym. 10, 41-47.
- 111) LEE, C.-P., AZZONE, G.F., ERNST, K.: Evidence for Energy-Coupling in Non-Phosphorylating Electron Transport Particles from Beef-Heart Mitochondria (1964) Nature 201, 152-159.
- 112) PULLMAN, M.E., PENEFSKY, H.S., DATTA, A., RACKER, E.: Partial Resolution of the Enzymes Catalysing Oxidative Phosphorylation (1960) J. Biol. Chem. 235, 3322-3328.
- 113) PULLMAN, M.E.: Measurement of ATPase, ^{14}C -ADP-ATP and $^{32}\text{P}_i$ -ATP Exchange Reactions (1967) Meth. Enzym. 10, 57-60.
- 114) ARCHBOLD, G.P.R., FARRINGTON, C.L., LAPPIN, S.A., MCKAY, A.M., MALPRESS, F.H.: Oxygen-Pulse Curves in Rat Liver Mitochondrial Suspensions (1979) Biochem. J. 180, 161-174.
- 115) BASHFORD, C.L., SMITH, J.C.: The Use of Optical Probes to Monitor Membrane Potential (1979) Meth. Enzym. 55, 569-586.
- 116) BASHFORD, C.L., THAYER, W.S.: Thermodynamics of the Electrochemical Proton Gradient in Bovine Heart Sub-mitochondrial Particles (1977) J. Biol. Chem. 252, 8459-8463.
- 117) NIEUWENHUIS, F.J.R.M., KANNER, B.I., GUTNICK, D.L., POSTMA, P.W., VAN DAM, K.: Energy Conservation in Membranes of Mutants of Escherichia Coli Defective in Oxidative Phosphorylation (1973) Biochem. Biophys. Acta 325, 62-71.
- 118) FIOLET, J.W.T., BAKKER, E.P., VAN DAM, K.: The Fluorescent Properties of Acridines in the Presence of Chloroplasts or Liposomes. On the Quantitative Relationship Between the Fluorescence Quenching and the Transmembrane Proton Gradient (1974) Biochim. Biophys. Acta 368, 432-445.

- 119) NELSON, Jr., R.D., LIDE, Jr., D.R., MARYOTT, A.A.:
CRC Handbook of Chemical Physics (1977)
58th ed., CRC Press Inc., Cleveland, Ohio, E 63-66.
- 120) TSOU, C.S., VAN DAM, K.: Dependence of the Efficiency
of Uncouplers on the Respiratory Rate (1969)
Biochim. Biophys. Acta 172, 174-176.
- 121) DANIELSON, L., ERNSTER, L.: Demonstration of a Mito-
chondrial Energy-Dependent Pyridine Nucleotide Trans-
hydrogenase Reaction (1963)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 91-95.
- 122) LEE, C.-P., ERNSTER, L.: The Energy-Linked Nicotinamide
Nucleotide Transhydrogenase Reaction: Its Characteris-
tics and its Use as a Tool for the Study of Oxidative
Phosphorylation (1965)
in: Regul. Metabol. Proc. Mito., TAGER, J.M., PAPA,
S. (ed.)
BBA Libr. Vol. 7, 218-234.
- 123) DANIELSON, L., ERNSTER, L. (1963)
in: Energy-Linked Functions of Mitochondria , CHANCE,
B. (ed.), Academic Press, New York, 157 ff, zit. aus 122.
- 124) DANIELSON, L., ERNSTER, L.: Energy-Dependent Reduction
of Triphosphopyridine Nucleotide by Reduced Diphospho-
pyridine Nucleotide Coupled to the Energy-Transfer
System of the Respiratory Chain (1963)
Biochem. Z. 338, 188-205.
- 125) MITCHELL, P., MOYLE, J.: Acid - Base Titration Across
the Membrane System of Rat Liver Mitochondria (1967)
Biochem. J. 104, 588-600.
- 126) BASHFORD, C.L., CHANCE, B., PRINCE, R.C.: Oxonol Dyes
as Monitors of Membrane Potential. Their Behavior in
Photosynthetic Bacteria (1979)
Biochim. Biophys. Acta 545, 46-57.
- 127) HANSTEIN, W.G., KIEHL, R.: Energy-Dependent Accumula-
tion of the Uncoupler Picrate and Proton Flux in Sub-
mitochondrial Particles (1981)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 100, 1118-1125.

- 128) VAN DAM, K., TER WELLE, H.F.: The Energy-Linked Trans-hydrogenase of Mitochondria (1965)
in: Regul. Metabol. Proc. Mito., TAGER, J.M., PAPA, S. (ed.)
BBA Libr. Vol. 7, 235-245.
- 129) SCHUURMANS, J.J., CASEY, R.P., KRAAYENHOF, R.: Transmembrane Electrical Potential Formation in Spinach Chloroplast (1978)
FEBS Lett. 94, 405-409.
- 130) ROTTENBERG, H.: The Measurement of Membrane Potential and pH in Cells, Organelles, and Vesicles (1979)
Meth. Enzym. 55, 547-569.
- 131) DROSDAT, H., KIEHL, R., HOFFMANN-POSORSKE, E., KORDT, S., HANSTEIN, W.G.: Isolation and Identification of Mitochondrial Uncoupler Binding Proteins (1982)
in: 2nd Eur. Bioenerg. Conf., Short Reports, 19-20.
- 132) KATRE, N.V., WILSON, D.F.: Interaction of Uncouplers with the Mitochondrial Membrane: Identification of the High Affinity Binding Site (1978)
Arch. Biochem. Biophys. 191, 647-656.
- 133) NICHOLLS, D.G.: Brown Adipose Tissue Mitochondria (1979)
Biochim. Biophys. Acta 549, 1-29.
- 134) LIN, C.S., KLINGENBERG, M.: Isolation of the Uncoupling Protein from Brown Adipose Tissue Mitochondria (1980)
FEBS Lett. 113, 299-303.
- 135) LIN, C.S., HACKENBERG, H., KLINGENBERG, M.: The Uncoupling Protein from Brown Adipose Tissue Mitochondria is a Dimer. A Hydrodynamic Study (1980)
FEBS Lett. 113, 304-306.
- 136) STOCKDALE, M., SELWYN, M.J.: Influence of Ring Substituents on the Action of Phenols on Some Dehydrogenases, Phosphokinases, and the Soluble ATPase from Mitochondria (1971)
Eur. J. Biochem. 21, 416-423.

- 137) STERLING, K., BRENNER, M.A., SAKURADA, T.: Rapid Effect of Triiodothyronine on the Mitochondrial Pathway in Rat Liver in Vivo (1980)
Science 210, 340-342.
- 138) LEADER, J.E., WHITEHOUSE, M.W.: Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by Some Salicylamide Derivatives (1966)
Biochem. Pharmacol. 15, 1379-1387.
- 139) ALTO, L.E., DHALLA, N.S.: Effects of Some Antiarrhythmic Agents on Dog Heart Mitochondrial Oxidative Phosphorylation (1979)
Eur. J. Pharmacol. 59, 311-314.
- 140) LAND, J.M., CLARK, J.B.: Mitochondrial Myopathies (1979)
Biochem. Soc. Trans. 7, 231-245.

Bisherige Veröffentlichung:

M. Schuermann und W.G. Hanstein:

Uncoupling of Energy-Dependent Transhydrogenation:

Unexpected Dependence on the Mode of Energization.

1st European Bioenergetic Conference, Urbino, Italy (1980)

EBEC Short Reports, Vol. 1, 243-244.

Danksagung

Für ihren Anteil an der Entstehung dieser Arbeit danke ich insbesondere

Herrn Prof. Dr. Walter Hanstein für sein außerordentliches Verständnis und seine ständige Hilfsbereitschaft, ohne dessen allseitige Unterstützung diese Arbeit kaum zustande gekommen wäre,

Herrn Dr. Reinhold Kiehl für die aktive Unterstützung bei vielen wichtigen Versuchen und Fragestellungen dieser Arbeit,

Frau S. Wüthrich-Scholz für die zeichnerische Assistenz. Die vorliegende Arbeit wäre ebenfalls schwer zustande gekommen ohne die mannigfaltige kollegiale Hilfe, die mir stets zuteil wurde. Daher möchte ich insbesondere Frau Ingrid Orth, Frau Helga Drosdat, Frau Sabine Kordt und Herrn Olusegun Akinpelu für die gemeinschaftlichen präparativen Arbeiten in diesem Labor herzlich danken.

Lebenslauf

- 3.11.1957 geboren als Sohn des Dr.-Ing. Fritz Schuermann und seiner Frau Susanne Schuermann, geb. Schneider, in Essen-Steele.
- 1964-67 Besuch der katholischen Volksschule in Niederwengern (Hattingen).
- 1967-76 Besuch des math.-naturw. und neusprachl. Gymnasiums Waldstraße in Hattingen. Erwerb des Abiturs im Frühsommer 1976.
- 1976-77 Ableistung des Grundwehrdienstes von 15 Monaten.
- Okt. 1977 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum.
- Aug. 1979 Ablegung der Ärztlichen Vorprüfung.
- Aug. 1980 Bestehen des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung.
- März 1983 Voraussichtlich Ablegung des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung.
- März 1979- Durchführung des experimentellen Teils der
Jan. 1981 Dissertation.
1981, 1982 Schriftliche Niederlegung.

